

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-517776

(P2013-517776A)

(43) 公表日 平成25年5月20日(2013.5.20)

(51) Int.Cl.
C12N 5/02 (2006.01)F1
C12N 5/02テーマコード (参考)
4B065

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁)

(21) 出願番号 特願2012-550188 (P2012-550188)
(86) (22) 出願日 平成23年1月24日 (2011.1.24)
(85) 翻訳文提出日 平成24年9月24日 (2012.9.24)
(86) 国際出願番号 PCT/US2011/022229
(87) 国際公開番号 W02011/091350
(87) 国際公開日 平成23年7月28日 (2011.7.28)
(31) 優先権主張番号 61/298,100
(32) 優先日 平成22年1月25日 (2010.1.25)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511203570
ベントリア・バイオサイエンス
Ventria Bioscience
アメリカ合衆国80525コロラド州フォ
ート・コリンズ、スウィート102、マイ
ルストーン・ドライブ2120番
(74) 代理人 100082072
弁理士 清原 義博
(72) 発明者 バーネット、マイケル
アメリカ合衆国 80525 コロラド州
フォート・コリンズ スイート 102
マイルストーン・ドライブ 2120

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の生成を改善するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、培養中の真核細胞に有益な組成物、及びその使用、及び細胞の成長、生存率及び組換えタンパク質の発現を促進させる際にそれらを使用するための方法に関する。本発明に開示される方法は、例えば、細胞生存率を向上させるために、及び培養中で育てられる細胞の細胞増殖の速度を加速させるのに有用である。1つの態様において、本発明の補足物は、細胞培養から組換えタンパク質の収量を向上させるか又は高めるために有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

培養中の細胞の細胞増殖を高める方法であって、
前記方法は、
細胞培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

無血清培地に適応させた細胞の生産性を高めるための方法であって、
前記方法は、
無血清培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 3】

バイオリアクター中の乳酸塩の蓄積を減少させるための方法であって、
前記方法は、
バイオリアクター中の培養中の細胞に、補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 4】

バイオリアクター中のグルコースおよび他の糖の消費を減少させる方法であって、
前記方法は、
バイオリアクター中の培養中の細胞に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 5】

培養の開始からバイオリアクター中での採取までの、タンパク質を生成するのに必要な時間を減少させる方法であって、
前記方法は、
バイオリアクター中の培養中の細胞に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 6】

バイオリアクター中の細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
バイオリアクターに、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 7】

無血清条件下で成長させた細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
無血清培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、

50

前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 8】

低密度で平板培養した際の細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
細胞培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 9】

単細胞クローンから成長させた細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
細胞培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 10】

培養物中で成長させたプライマリー細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
細胞培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 11】

トランスフェクション後の細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
トランスフェクションの前、間、または、直後の細胞培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 12】

凍結保存後の細胞の生存率を改善するための方法であって、
前記方法は、
凍結保存または解凍の前、間、または、直後の細胞培地に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 13】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物の収量を改善するための方法であって、
前記方法は、
培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 14】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物の精製を改善するための方法であって、
前記方法は、

50

培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 15】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物のタンパク質分解を減少させるための方法であって、

前記方法は、
培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 16】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物の生物活性を改善するための方法であって、

前記方法は、
培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 17】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物の安定性を改善するための方法であって、
前記方法は、

培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 18】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物のアセンブリを改善するための方法であって、

30

前記方法は、
培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 19】

培養中の細胞から生成された組み換え生成物のヒトパターンに近いグリコシル化を形成するための方法であって、

前記方法は、
培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、
前記アルブミンは約 2 % 未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 20】

免疫原性の少ない培養中の細胞から生成された組み換え生成物を作るための方法であって、

前記方法は、
培養物に、組み換えアルブミンを含む補足物を追加する工程を含み、
前記組み換えアルブミンは植物中で生成され、
前記補足物は約 1 E U エンドトキシン / 1 m g アルブミン未満を有し、および、

50

前記アルブミンは約 2 %未満の凝集アルブミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 1】

培養中の細胞の生存率が増加することを特徴とする請求項 1 3 乃至 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2】

細胞は組織培養細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3】

細胞は CHO 細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞はハイブリドーマ細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5】

細胞はペロ細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 6】

細胞はフローサイトメトリーによって選別されることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 7】

細胞はプライマリー細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 8】

プライマリー細胞は幹細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

プライマリー細胞は B 細胞由来であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

プライマリー細胞は T 細胞由来であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 1】

細胞は B 細胞であるか、または、B 細胞由来であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 2】

細胞は T 細胞であるか、または、T 細胞由来であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 3】

細胞はフローサイトメトリーによって単離されることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 4】

細胞はマイクロ流体素子によって単離されることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 5】

細胞は単細胞のサブクローニングによって単離されることを特徴とする請求項 1 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

生成物は、タンパク質、ワクチン、細胞に関連する細菌またはウイルスであることを特徴とする請求項 1 3 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 7】

タンパク質は抗体であることを特徴とする請求項 4、1 3 乃至 2 1 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

タンパク質は組み換えタンパク質であることを特徴とする請求項 13 乃至 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 39】

タンパク質は単量体であることを特徴とする乃至 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 40】

タンパク質は多量体タンパク質であることを特徴とする請求項 13 乃至 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 41】

抗体は完全長であることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 42】

抗体は一本鎖抗体であることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 43】

前記補足物は熱ショックタンパク質の少なくとも約 0.01 % w t / w t を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 42 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

前記熱ショックタンパク質はイネの熱ショックタンパク質であることを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記熱ショックタンパク質は、イネ H S P 70 遺伝子とイネの胚乳腔の結合タンパク質とからなる群から選択されることを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

20

【請求項 46】

熱ショックタンパク質は、イネ (g b | A C J 5 4 8 9 0 . 1 |) 、 E E C 6 9 0 7 3 / O s I _ 3 7 9 3 8 、 および、 A A B 6 3 4 6 9 からなる群から選択されることを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 47】

前記補足物は少なくとも約 0.01 % w t / w t H S P 70 を含むことを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 48】

前記補足物は少なくとも約 0.04 % w t / w t H S P 70 を含むことを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

30

【請求項 49】

前記補足物は少なくとも約 0.06 % w t / w t H S P 70 を含むことを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 50】

前記補足物は少なくとも約 0.08 % w t / w t H S P 70 を含むことを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 51】

前記補足物は少なくとも約 0.1 % w t / w t H S P 70 を含むことを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

40

【請求項 52】

前記組み換えアルブミンは、約 100 m g / L と約 200 m g / L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 53】

前記組み換えアルブミンは、約 200 m g / L と約 400 m g / L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 54】

前記組み換えアルブミンは、約 400 m g / L と約 600 m g / L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 55】

50

前記組み換えアルブミンは、約 600 mg/L と約 800 mg/L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 56】

前記組み換えアルブミンは、約 800 mg/L と約 1000 mg/L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 57】

前記組み換えアルブミンは、約 1000 mg/L と約 2000 mg/L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 58】

前記組み換えアルブミンは、約 2000 mg/L と約 5000 mg/L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 59】

前記組み換えアルブミンは、約 5000 mg/L と約 10000 mg/L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 60】

前記組み換えアルブミンは、約 10000 mg/L と約 20000 mg/L の間の最終濃度になるまで加えられることを特徴とする請求項 1 乃至 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 61】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、10%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 62】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、15%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 63】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、20%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 64】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、25%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 65】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、30%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 66】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、40%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 67】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、50%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 68】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、60%以上であることを特徴とする請求項 6 乃至 12、および、21 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 69】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、70%以上であることを特徴とする請求項6乃至12、および、21のいずれかに記載の方法。

【請求項 70】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、80%以上であることを特徴とする請求項6乃至12、および、21のいずれかに記載の方法。

【請求項 71】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、90%以上であることを特徴とする請求項6乃至12、および、21のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 72】

細胞の生存率の改善は、理想的な条件下であるが、前記補足物を含まない条件下で成長させた細胞の細胞生存率と比較して、100%以上であることを特徴とする請求項6乃至12、および、21のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

20

本出願は、2010年1月25日に提出された米国仮特許出願第61/298,100号の利益を主張するものであり、その全体は引用によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、培養中の真核細胞に有益な組成物とその使用、および、細胞の成長、生存率、ならびに、組み換えタンパク質の発現を促進する際に使用される方法に関する。

【背景技術】

【0003】

生物学的プロセスの調査は、生物体全体に満たない細胞、組織および器官でのそれらのプロセスの調査を必要とする。長年にわたって、これらの細胞、組織および器官は、生物体から分離され、エキソビボまたはインビトロの様式での生存を維持する条件下で独立的に研究されてきた。典型的には、細胞、組織または器官は、生物体から取り除かれ、研究されている生存および／または生物学的プロセスを維持する培地で維持される。細胞、組織、器官の様々な多様性を考慮すると、インタクトな生物体以外で、それらの生存、成長、および、生物学的な特性を維持する培地の処方重要ではない。多くの細胞および組織は、完全には理解されていない理由のため、培養で維持するのが難しい。加えて、細胞と組織は、生物医学研究および生物製剤ベースの薬物の鍵である、組み換えタンパク質、ワクチン、ウイルスストック(virus stocks)および他の生成物のインビトロでの製造に関係するプロセスでしばしば使用される。したがって、インビトロとエキソビボでの条件下での、細胞、組織および器官の培養の成長と生存を維持する条件および培地成分を特定する必要がある。

30

40

【0004】

そのような細胞成分には、例えば、アルブミン、トランスフェリン、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(transferees)、スーパーオキシドジスムターゼ、ラクトフェリン、および、成長因子が挙げられる。

【0005】

アルブミンは血漿中で見られる最も豊富なタンパク質である。それは哺乳動物の肝臓で生成され、様々な能力で機能する。アルブミンは、血清タンパク質の約2分の1を含む、可溶性の単量体タンパク質である。アルブミンは、主に、ステロイド、脂肪酸、および、甲状腺ホルモンのための担体タンパク質として機能し、細胞外液量を安定させる役割を果たす。アルブミンは分子量67,000の球状の非グリコシル化血清タンパク質であり、

50

5 または 6 の内部ジスルフィド結合を含有する。アルブミンは、新生タンパク質が粗面小胞体から放される前に取り除かれる N 末端ペプチドを有するプレプロアルブミン (preproalbumin) として合成される。生成物、つまり、プロアルブミンは、分泌されたアルブミンを生成するために、ゴルジ小胞で順に開裂される。

【0006】

アルブミンは、血管内コンパートメントと体内組織の間の体液の適切な分布に必要とされる浸透圧を維持するのに必要不可欠である。アルブミンは、同様に、複数の疎水性のステロイドホルモンを非特異的に結合することによって血漿担体として、および、ヘミンと脂肪酸のための輸送タンパク質として作用する。ウシ血清アルブミン (BSA) は、1-20% 総量で基本培地に一般的に加えられるウシ胎児血清 (FBS) の成分であるため、細胞培地中の補足物 (supplement) として長く使用されてきた。BSA は多くの定義された無血清の主成分である培地処方中の主要な成分である。というのも、BSA は容易に入手可能で、比較的廉価で、比較的容易に均一に精製することができるからである。アルブミンの代表源は、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、および、他の哺乳類種に由来する血漿を含む。

【0007】

ヒトへの臨床的な用途を対象とした組み換えタンパク質、ワクチンおよび他の生成物の大量生産の到来により、これらの生成物の製造中に使用される製剤に関するさらに厳密な必要条件が課された。生成物の安全性に影響を与える病原体を保護する動物性の物質の脅威のために、多くの既存の組み換え生成プロセスが修正されたことで、全プロセスで使用される物質または培養成分すべてが動物性の生成物を欠いている。すなわち、細胞培養成分は、全ての動物源から分離されたか精製されたはずがない。したがって、動物界全体から直接的なこれらの補足物の精製に対する代替策として、培地の補足物の組み換え生成が好ましい。これに応じて、ヒトと他の種からの細胞培養成分は、組み換え手段を用いて、定義された組織培地を用いて、および、高く特徴づけられた培養細胞を用いて、製造することができ、それらはウイルスと毒素がないことが証明されている。

【0008】

組み換えタンパク質ベースの細胞培養成分を調製する 1 つの方法は、タンパク質を過剰発現させ、その後、タンパク質を精製するために酵母または植物を操作することである。ヒトにも感染しかねない植物ウイルスの例が存在しないため、植物由来の組み換えタンパク質は、治療用途を意図したヒトタンパク質の組み換えタンパク質生成のための、細胞培養成分の源として特に魅力的である。

【0009】

幹細胞を成長および分化させるだけでなく、ヒトの治療用タンパク質の組み換え生成を維持する組み換え細胞培養成分の需要が高く、このような生成物が次々と成功を収めて市場における将来性が非常に大きいことから、組み換え細胞培養成分を生成するもっと効果的な方法が望ましい。特に、タンパク質の組み換え生成と幹細胞の成長および分化のための既存のプロセスは、緩慢で、高価で、骨が折れる。一つには、これらのプロセスは、細胞の成長速度と、組み換え宿主細胞または幹細胞の生存率の割合とにそれぞれ関連する、基本的な態様によって限定されている。これらの制限の重要な態様は、i) 細胞の複雑な混合物から単細胞クローンを急速に分離し発展させる能力、ii) 急速に、とりわけ、低密度で、かつ、無血清培地で細胞の成長を促進する能力、iii) バイオリアクター中で高密度で細胞の成長と生存率を持続させる能力、iv) 高い生存率を維持しながら、細胞および細胞バンクを凍結保存および解凍する能力、v) 幹細胞培養物を、効果的に成長および分化させる能力を含む。従って、これらのニーズに対処するとともに、培養中の細胞の成長と生存率の改善を可能にする、改良された培地と培養条件が必要とされている。本発明の補足および方法は、生存率と細胞増殖の速度とを改善することによって、これらのニーズを満たし、哺乳動物の細胞培養生成プロセスから得られる組み換え生成物の収量と質の改善をもたらすこともできる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、植物由来の組み換え細胞培養成分タンパク質が、標準的な精製タンパク質よりも大きな程度まで培地で成長させた哺乳動物細胞に加えられる際に、細胞の成長と生存率を驚くべきほど改善したという実証に部分的には基づいている。そのような植物由来の細胞培養成分は、組織と細胞の培養に役立つ補足物を作るために使用されてもよい。

【0011】

本出願で開示される方法と補足は、例えば、細胞の生存率を改善するために、および、培養で成長させた細胞の細胞増殖速度を早める際に、有用である。1つの態様では、本発明の補足は、細胞培養物からの組み換えタンパク質の収量を改善するか高めるのに役立つ。本発明によって提供されるさらなる改善は、以下に詳細に記載される。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞の細胞増殖を高める方法を含む。

【0013】

1つの実施形態では、本発明は、無血清培地への補足物の追加を含む、無血清培地に適応させた細胞の生産性を高めるための方法を含む。

【0014】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクター中の培養中の細胞への補足物の追加を含む、バイオリアクター中の乳酸塩の蓄積を減少させるための方法を含む。

20

【0015】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクター中の培養中の細胞への補足物の追加を含む、バイオリアクター中のグルコースおよび他の糖の消費を減少させる方法を含む。

【0016】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクター中の培養中の細胞への補足物の追加を含む、培養の開始からバイオリアクター中での採取までの、タンパク質を生成するのに必要な時間を減少させる方法を含む。

【0017】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクターへの補足物の追加を含む、バイオリアクター中の細胞の生存率を改善する方法を含む。

30

【0018】

1つの実施形態では、本発明は、無血清培地への補足物の追加を含む、無血清条件下で成長させた細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0019】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への補足物の追加を含む、低密度で平板培養 (plated) した際の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0020】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への補足物の追加を含む、単細胞クローンから成長させた細胞の生存率を改善するための方法を含む。

40

【0021】

1つの実施形態では、本発明は、培地への補足物の追加を含む、培養物中で成長させたプライマリー細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0022】

1つの実施形態では、本発明は、トランスフェクションの前、間、または、直後の、細胞培地への補足物の追加を含む、トランスフェクション後の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0023】

1つの実施形態では、本発明は、凍結保存または解凍の前、間、または、直後の、細胞培地への補足物の追加を含む、凍結保存後の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

50

【0024】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の収量を改善するための方法を含む。

【0025】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の精製を改善するための方法を含む。

【0026】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物のタンパク質分解を減少させるための方法を含む。

【0027】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の生物活性を改善するための方法を含む。

【0028】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の安定性を改善するための方法を含む。

【0029】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物のアセンブリ (assembly) を改善するための方法を含む。

【0030】

1つの実施形態では、本発明は、培養への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物のヒトパターンに近い (a more human pattern) グリコシル化を形成するための方法を含む。

【0031】

1つの実施形態では、本発明は、組み換えアルブミンを含む補足物の培養への追加を含む、免疫原性の少ない培養中の細胞から生成された組み換え生成物を作るための方法を含む。

【0032】

組み換え生成方法の1つの態様では、培養中の細胞の生存率が増加する。

【0033】

これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は組み換えアルブミンを含み、前記組み換えアルブミンは植物で生成され、前記補足物は、約1 EU エンドトキシン / 1 mg アルブミン未満 (about 1 EU of endotoxin, / mg of albumin) を有し、前記アルブミンは約2%未満の凝集アルブミンを含む。

【0034】

これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はプライマリー細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞は幹細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞は組織培養細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞は血球である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はプライマリー単核細胞 (primary mononuclear cells) である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はCHO細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はハイブリドーマ細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はペロ細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はフローサイトメトリーによって選別される。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞は勾配遠心分離によって分離されたプライマリー細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はB細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はT細胞である。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はフローサイトメトリーによって単離される。これらの方法のいずれか1つの態様では、細胞はマイクロ流体素子によって単離される。

【0035】

これらの方法のうちのいずれかの1つの態様では、補足物は、熱ショックタンパク質の少なくとも約0.01% wt / wtを含む。この方法の1つの態様では、熱ショックタン

10

20

30

40

50

パク質はイネの熱ショックタンパク質 (a r i c e h e a t s h o c k p r o t e i n) である。この方法の1つの態様では、熱ショックタンパク質は、イネHSP70遺伝子とイネの胚乳腔の結合タンパク質 (e n d o s p e r m l u m e n a l b i n d i n g p r o t e i n) とからなる群から選択される。この方法の1つの態様では、熱ショックタンパク質は、イネ (g b | A C J 5 4 8 9 0 . 1 |) 、 E E C 6 9 0 7 3 / O s I _ 3 7 9 3 8 、 および、 A A B 6 3 4 6 9 からなる群から選択される。

【0036】

これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は、少なくとも約0.01%wt/wt HSP70を含む。これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は、少なくとも約0.04%wt/wt HSP70を含む。これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は、少なくとも約0.06%wt/wt HSP70を含む。これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は、少なくとも約0.08%wt/wt HSP70を含む。これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は、少なくとも約0.1%wt/wt HSP70を含む。

【0037】

これらの方法のいずれかの1つの態様では、補足物は、約100mg/Lと約200mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる組み換えアルブミンを含む。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約200mg/Lと約400mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約400mg/Lと約600mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約600mg/Lと約800mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約800mg/Lと約1000mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約1000mg/Lと約2000mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約2000mg/Lと約5000mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約5000mg/Lと約10000mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。これらの方法のいずれかの1つの態様では、組み換えアルブミンは、約10000mg/Lと約20000mg/Lとの間の最終濃度になるまで加えられる。

【0038】

これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、10%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、15%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、20%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、25%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、30%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、40%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、50%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、60%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、70%以上である。これらの方法のい

10

20

30

40

50

いずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、80%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、90%以上である。これらの方法のいずれかの1つの態様では、細胞の生存率の改善は、同一の条件下であるが前記補足物を含まずに成長させた細胞の細胞生存率と比較して、100%以上である。

【図面の簡単な説明】

【0039】

本発明の特徴および利点の優れた理解は、本発明の原理が利用される具体例を説明する以下の詳細な記載と、添付の図面を参照することによって得られる。

10

【0040】

【図1A】アルブミンの他のソースおよび精製方法と比較した、イネから生成される組み換えアルブミンのHPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる比較を示す。血清由来（非組み換えアルブミン）のクロマトグラムを示す。

【図1B】アルブミンの他のソースおよび精製方法と比較した、イネから生成される組み換えアルブミンのHPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる比較を示す。精製のための「旧プロセス」B000を用いて作られたイネの組み換えアルブミン（Cellastim P0107）のクロマトグラムを示す。

【図1C】アルブミンの他のソースおよび精製方法と比較した、イネから生成される組み換えアルブミンのHPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる比較を示す。精製のための「新プロセス」B0000Cを用いて作られたイネの組み換えアルブミン（Cellastim P0171）のクロマトグラムを示す。

20

【図1D】アルブミンの他のソースおよび精製方法と比較した、イネから生成される組み換えアルブミンのHPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる比較を示す。血清由来アルブミン（1A；点線）と、新プロセス（1C；実線）を用いて調製されたCellastimのクロマトグラムの重なりを示す。

【図1E】アルブミンの他のソースおよび精製方法と比較した、イネから生成される組み換えアルブミンのHPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる比較を示す。旧プロセスB000を用いて調製されたCellastim（Cellastim P0107）（1B；点線）と、新プロセスB0000Cを用いて調製されたCellastim（Cellastim P0171）（1C；実線）のクロマトグラムの重なりを示す。

30

【図2】アルブミンの他のソースおよび精製方法と比較した、イネから生成される組み換えアルブミンのSDS PAGE分析による比較を示す。図2Aは、Cellastim P0171とCellprimeアルブミン（Millipore/Novozymes）の比較を示す。レーン1は分子量マーカである。レーン4はCellastimアルブミン（10μg）であり、レーン7はCellprimeアルブミン（10μg）である。図2Bは、前の工程（B000）（レーン2、3および4）と、新しいCellastimプロセス（B0000C）（レーン6、7および8）からの3つのCellastimロットのSDS PAGE分析による比較を示す。6つのサンプルは1レーン当たり20μgで負荷（load）される。

40

【図3】細胞の増殖と生存率に関して、酵母組み換え（Cellprime）、ヒト由来（Seracare）、および、植物組み換えアルブミン（Cellastim P0171）の効果の比較を示す（図3A）。図3Bは、組み換えアルブミン生成に、旧プロセス（B000）と新プロセス（B0000C）を用いて生成されたアルブミンのバッチにおけるエンドトキシンレベルの比較を示す。図3Cは、組み換えアルブミン生成に、旧プロセス（B000）と新プロセス（B0000C）を用いて生成されたCellastimの存在下で成長させた細胞の細胞増殖と生存率の比較を示す。

【図4】ATP親和性クロマトグラフィー後の組み換えアルブミンから得られた異なる画分の熱ショックタンパク質の含有量を示すために、抗熱ショックタンパク質抗体を用いるウェスタンブロットを示す（例3を参照）。

50

【図 5】熱ショックタンパク質を取り除くために、新しいプロセスを用いて生成されたアルブミンを、A T Pアフィニティカラム全体に通した後に、C e l l a s t i m組み換えアルブミンの細胞増殖と生存率の効果の比較を示す（詳細に関してはテキストを参照）。

【図 6 A】振盪フラスコ内における、補足していない（u n s u p p l e m e n t e d）培地と補足した培地のC H O - K 1の成長特性を示す。

【図 6 B】補足していない培地と補足した培地におけるC H O - K 1の生細胞のパーセンテージを示す。

【図 7 A】振盪フラスコ内における補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたC H O - K 1細胞の特異的な純増加率（n e t g r o w t h r a t e）を示す。

【図 7 B】振盪フラスコ内における補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたC H O - K 1細胞の特異的な純死亡率（n e t d e a t h r a t e）を示す。

【図 8 A】補足していない培地と補足した培地（4日目に栄養のある食事を与えた）での生存細胞密度（v i a b i l i t y c e l l d e n s i t y）を示す。

【図 8 B】補足していない培地と補足した培地（4日目に栄養のある食事を与えた）でのC H O - K 1の生細胞のパーセンテージを示す。

【図 9 A】（4日目に栄養のある食事によりブーストされた）振盪フラスコ内の補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたC H O - K 1細胞の特異的な純増加率を示す。

【図 9 B】（4日目に栄養のある食事によりブーストされた）振盪フラスコ内の補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたC H O - K 1細胞の特異的な純死亡率を示す。

【図 9 C】振盪フラスコ中の補足物を含む培地で抗体の濃度の増加を示す。

【図 10 A】負荷をかける際の有害事象後のバイオリアクター中のC H O - K 1の成長特性を示す。2つのバイオリアクターが250mg/LのC e l l a s t i m条件について用いられた。

【図 10 B】負荷をかける際の有害事象の後のバイオリアクター中のC H O - K 1の生細胞のパーセンテージを示す。2つのバイオリアクターが250mg/LのC e l l a s t i m条件について用いられた。

【図 11 A】（3日目と7日目に栄養物をブーストされた）補足していない培地と補足した培地における、バイオリアクター中のC H O - K 1の成長特性を示す。経時的な生存細胞の密度が示されている。

【図 11 B】（3日目と7日目に栄養物をブーストされた）補足していない培地と補足した培地における、バイオリアクター中のC H O - K 1の特異的な増殖率を示す。経時的な生存細胞の密度が示されている。

【図 12 A】（3日目と7日目に栄養物をブーストされた）補足していない培地と補足した培地における、有害な事象後のバイオリアクター中のC H O - K 1の生細胞のパーセンテージを示す。

【図 12 B】（3日目と7日目に栄養物をブーストされた）バイオリアクター内の補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたC H O - K 1細胞の特異的な純死亡率を示す。

【図 13 A】バイオリアクター中の補足していない培地と補足した培地で成長させたC H O - K 1のpH傾向を示す。

【図 13 B】バイオリアクター中の補足していない培地と補足した培地で成長させたC H O - K 1のモル浸透圧濃度の傾向を示す。

【図 14 A】（3日目と7日目に栄養のある食事を含む）バイオリアクター内の補足していない培地と補足した培地で成長させた育てられたC H O - K 1のグルコース傾向を示す。

【図 14 B】（3日目と7日目に栄養のある食事を含む）バイオリアクター内の補足していない培地と補足した培地で成長させたC H O - K 1の乳酸塩の傾向を示す。

【図 15 A】（3日目と7日目に栄養のある食事をブーストされた）バイオリアクター内

10

20

30

40

50

の補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたCHO K1細胞の特異的なグルコース消費を示す。

【図15B】（3日目と7日目に栄養のある食事をブーストされた）バイオリアクター内の補足していない培地（対照）と補足した培地で成長させたCHO K1細胞の特異的な乳酸塩の生成を示す。

【図16A】（3日目と7日目の栄養のある食事を含む）バイオリアクター内の補足していない培地と補足した培地でのCHO K1によって生成される生成物の濃度を示す。

【図16B】（3日目と7日目の栄養のある食事を含む）バイオリアクター内の補足していない培地と補足した培地でのCHO K1の特異的な生産性を示す。

【図17A】タンパク質Aクロマトグラフィーによる抗体の精製で使用方法の概略図を示す。

【図17B】平衡、負荷、洗浄、および、を示す吸収クロマトグラム、積み荷、洗浄、および、回避された画分（eluted fractions）を示す。精製された抗体を表す、回避された画分中のタンパク質の1つの強力なピークがあることに注意する。

【図18】抗体の精製と、プロテインAクロマトグラフィーによる培地補足物の成功した除去とを示す、クーマシーブルー染色によるSDS-PAGEを示す。

【図19】抗体の精製と、プロテインAクロマトグラフィーによる培地補足物の成功した除去とを示す、銀染色によるSDS-PAGEを示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

（定義）

本開示がより容易に理解されるように、特定の用語が最初に定義される。さらなる定義は、詳細な記載の全体を通じて説明される。

【0042】

用語「約（about）」あるいは「およそ（approximately）」は、当業者に定められるような特定の値の許容可能な誤差の範囲内であることを意味し、それは、部分的に、その値がどのように計測されるか、または、測定されるか、すなわち、測定システムの限定に依存する。例えば、「約（about）」は、当該技術分野において、実行ごとに1以上の標準偏差内であることを意味することができる。あるいは、「約（about）」は、組成に関連して、最大で20%まで、好ましくは10%まで、もっと好ましくは5%までの範囲のプラスまたはマイナスを意味することができる。本明細書で使われるように、用語「増加」または関連語「増加した」は、統計的に有意な増加を指す。誤解を避けるために、それらの用語は、一般的に、所定のパラメーターの少なくとも10%の増加を指し、少なくとも20%、50%、75%、100%、150%以上を包含することができる。

【0043】

用語「抗原結合フラグメント」は、抗原結合（すなわち、特異的な結合）のために、抗原と結合するか、または、インタクトな抗体（すなわち、それらが由来するインタクトな抗体）と競合する免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド部分のことを指す。結合フラグメントは、組み換えDNA技術によって、または、インタクトな免疫グロブリンの酵素的開裂または化学分解によって生じさせることができる。結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、単一の鎖、および、単一の鎖の抗体を含む。

【0044】

用語「アポトーシス」（「標準の」または「プログラム」細胞死）は、望まれない細胞または役立たない細胞が、発達段階および他の正常な生物学的プロセスの間に除去される生理学的プロセスのことを指す。アポトーシスは正常な生理学的条件下で生じる細胞死の形態であり、細胞はみずからの死に積極的に関与するものである（「細胞の自殺」）。それは、通常の細胞交替（cell turnover）および組織の恒常性維持、免疫寛容の胚形成、誘導、維持、神経系の発達、および、内分泌腺に依存する組織の萎縮症のあ

10

20

30

40

50

いだに最もよく見られる。アポトーシスも、ストレスに反応した組織培養条件下で成長させた細胞でも誘発されてもよい。アポトーシスを経験した細胞は、容易に測定および定量可能な、特徴的な形態学に関する特徴、および、生化学的な特徴を示す。これらの特徴は、クロマチン凝集、核および細胞質の凝縮、細胞質および核の、リボソームを含有する膜結合小胞（アポトーシス小体）への分割、形態学的にインタクトなミトコンドリアおよび核物質を含む。インビボで、これらのアポトーシス小体は、マクロファージまたは隣接する上皮細胞のいずれかによって、迅速に認識され、食菌される。

インビボでのアポトーシス細胞の除去のためのこのような効率的な機構により、炎症反応は誘発されない。インビトロで、残存する細胞フラグメントと同様に、アポトーシス小体も最後に膨潤して最終的には溶解する。インビトロの細胞死のこの終末過程は「第2のネクローシス」と呼ばれている。

【0045】

本明細書で使用されているように、用語「細胞 (cell、cells)」、「株化細胞」、「宿主細胞 (host cell、host cells)」は、互換的に使用され、植物と動物の細胞を含有し、無脊椎の非哺乳動物と脊椎の哺乳動物の細胞を含む。そのような指定はすべて細胞集団と子孫を含む。したがって、「形質転換体」および「形質移入体」という用語は、移入の数に関係なく、それらに由来するプライマリー対象細胞 (primary subject cell) および株化細胞を含んでいる。典型的な非哺乳動物の脊椎動物細胞は、例えば、トリの細胞、爬虫類の細胞、および、両生類の細胞を含んでいる。典型的な無脊椎動物細胞は、限定されないが、例えば、イモムシ (スポドプテラ・フルギベルダ) 細胞、蚊 (ネッタイシマカ) 細胞、ショウジョウバエ (キイロショウジョウバエ) 細胞、シュナイダー (Schneider) 細胞、および、カイコ細胞のような昆虫細胞を含む。例えば、Luckow et al., Bio/Technology 6: 47-55 (1988) を参照。細胞は分化しても、部分的に分化しても、または、未分化であってもよく、例えば、幹細胞は、胚性幹細胞と多能性幹細胞を含む。さらに、器官または臓器系に由来する組織サンプルは、本発明にしたがって使用されてもよい。典型的な哺乳動物細胞は、例えば、ヒト、人類以外の霊長類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、マウス、ハムスター、ネズミおよびモルモットを含むげっ歯類、ならびに、任意の誘導体およびその子孫に由来する細胞を含んでいる。

【0046】

用語「細胞培養」または「組織培養」は、懸濁液中で成長させた、または、ローラーボトル (roller bottles)、細胞培養フラスコ、皿、マルチプルプレートなどの容器内で様々な表面または基質に付着させて成長させた細胞のことを言う。攪拌された発酵槽内でマイクロキャリアに付けられたまま成長する接着細胞を含む、バイオリアクターのような大規模な手法も、用語「細胞培養」に包含される。さらに、接触依存性の細胞を培養するだけでなく、請求される本発明の方法で懸濁培養技術を用いることも可能である。Butler, Spier & Griffiths, Animal cell Biotechnology 3: 283-303 (1988) で記載されているように、典型的なマイクロキャリアは、例えば、デキストラン、コラーゲン、プラスチック、ゼラチン、および、セルロース他を含んでいる。例えば、Cytoline (商標) または Cytopore (商標) などの多孔質担体は、例えば、DEAEデキストラン (Cytodex 1 (商標) 第四級アミンでコーティングしたデキストラン (Cytodex (商標)) などのデキストランベースの担体、または、ゼラチンでコーティングしたデキストラン (Cytodex 3 (商標)) などのゼラチンベースの担体などと同じように、使用されてもよい。タンパク質の大規模生産と小規模生産の双方のための細胞培養手順は、本発明によって包含される。流動床バイオリアクター、中空繊維バイオリアクター、ローラーボトル培養、または、攪拌タンクバイオリアクター (tank bioreactor) システムを含むがこれらに限定されない手順は、マイクロキャリアを用いて／用いずに、使用されてもよく、バッチ、フェドバッチ (fed-batch)、または、灌流方式で操作されてもよい。

10

20

30

40

50

【0047】

「細胞培地」および「培地」は、細胞と株価細胞を成長させ、貯蔵し、処理し、および、維持するために使用される溶液を指す。そのような溶液は、一般に、細胞の付着、成長、および、細胞環境の維持に必要な様々な因子を含んでいる。例えば、典型的な溶液は、基本培地製剤、細胞の種類に依存する様々な補足物、および、時として抗生物質を含んでもよい。幾つかの実施形態では、溶液は、以下のカテゴリーの1つ以上から少なくとも1つの成分を含んでもよい。1) 通常、グルコースのような炭水化物の形をしているエネルギー源；2) すべての必須アミノ酸、および、通常、20のアミノ酸シスチンとの基礎的なセット；3) 低濃度で必要とされるビタミンおよび／または他の有機化合物；4) 遊離脂肪酸；および、5) 微量元素。微量元素は通常マイクロモルの範囲で、非常に低い濃度で一般的に必要とされる無機化合物または自然に発生する要素として定義される。溶液は、以下のカテゴリーのいずれかからの1以上の構成要素で随意に補足されてもよい。1) 例えば、インシュリン、トランスフェリンおよび表皮成長因子としてのホルモンおよび他の成長因子；2) 例えば、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩、T r i s、H E P E S、および、炭酸水素ナトリウムとしての塩類および緩衝液；3) 例えば、アデノシンおよびチミジン、ヒポキサンチンのようなヌクレオシド、および、塩基；および、4) タンパク質および組織の加水分解産物。一般的に、任意の適切な細胞培地が使用されてもよい。培地は、例えば、ウシ胎児血清、仔ウシ血清、および、同種のものなどといった血清で構成されてもよい。あるいは、培地は、無血清の、動物質を含まない、または、タンパク質を含まないものであってもよい。

10

20

【0048】

幹細胞培養を指す際の用語「細胞系統」は、最も初期の前駆細胞から完全に成熟した細胞（すなわち、特殊化した細胞）まで、細胞型の成長の段階すべてを指す。

【0049】

「細胞の生存率」または「生存率」という用語は、任意の所定の時間での細胞集団で示される、生細胞と死細胞の相対量を指す。細胞の生存率は、細胞集団の任意の所定のサンプルにおける生細胞と死細胞の相対数を測定することにより決定されてもよい。細胞の生存率は、細胞増殖と細胞死の速度の全体的なバランスを表す全個体数の細胞増殖の速度を測定することによって評価されてもよい。細胞増殖の速度は、細胞の数を数えることによって、および、細胞増殖の速度を直接記録する任意の数の市販の細胞増殖アッセイを使用することによって、直接的に測定されてもよい。

30

【0050】

「馴化培地」は、幹細胞が培養することができ、多能性状態で培養および維持することができるフィーダー細胞の培養物から得られる細胞培地を指す。フィーダー細胞はいくつかの成分の馴化培地を消耗するだけでなく、十中八九は少量の成長因子を含む細胞由来の材料で培地を豊かにする。本明細書で使用されるように、用語「フィーダー細胞因子」とは、フィーダー細胞によって馴化培地へと放出される細胞由来の材料を意味する。細胞培地に放出される細胞因子は、幹細胞の成長を高めるのに役立つか、または、多能性状態の胚性幹細胞の維持に役立つ。フィーダー細胞因子は、当業者に知られている技術を用いて特定および精製可能であり、本明細書に記載されている。

40

【0051】

用語「保存アミノ酸置換」または「保存変異」は、共有物を含む別のアミノ酸によって1つのアミノ酸の置換を指す。個々のアミノ酸間の共有物を定義する機能的な手法は、類似する有機体の対応するタンパク質間のアミノ酸変化の正規化周波数を分析することである (Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。そのような分析によると、1つの群内のアミノ酸が互いに優先的に交換する場合、アミノ酸の複数の群を定義することができ、それ故、タンパク質構造全体に対する影響という点で互いにもっとも類似している (Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, , Sprin

50

ger- Verlag)。

【0052】

このように定義されたアミノ酸基の例は次のものを含んでいる：Glu, Asp, Asn, Gln, Lys, ArgおよびHisからなる「荷電群／極性群」、Pro, Phe, Tyr、および、Trpからなる「芳香族基、または、環状基」、および、Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Ser, Thr および Cys からなる「脂肪族基」。

【0053】

各々の基内で、下位の基は確認することができ、例えば、荷電アミノ酸／極性アミノ酸の基は、Lys, Arg および His からなる「陽電荷の下位の基」からなる下位の基に、Glu および Asp からなる陰電荷の下位の基に、ならびに、Asn と Gln からなる「極性の下位の基」に再分割されてもよい。芳香族基または環状基は、Pro、His、および、Trp からなる「窒素環の下位の基」からなる下位の基に、および、Phe と Tyr からなる「フェニル下位の基」とに再分割可能である。脂肪族基は、Val、Leu、および、Ile からなる「大脂肪族の非極性の下位の基」からなる下位の機に、Met, SER, Thr および Cys からなる「脂肪族のわずかに極性を有する下位の基」に、および、Gly と Ala からなる「小さな残留物の下位の基」に再分割されてもよい。

【0054】

保存的変異の例は、上記の下位の基内部にアミノ酸の置換基を、例えば、陽電荷が維持されることができるようArgについてLys（その逆も同じ）を、陰電荷が維持されることができるようAspについてGlu（その逆も同じ）を、遊離-OHが維持されることができるようThrについてSer（その逆も同じ）を、および、遊離-NH₂が維持されることができるようAsnについてGln（その逆も同じ）を含む。

【0055】

用語「細胞毒性」は、化合物（化学汚染物質またはタンパク質の汚染物質、洗剤、または、トキシシンなど）の細胞死滅特性を指す。ネクローシスとアポトーシスとは対照的に、細胞毒性という用語は、必ずしも特定の細胞死機構を示すとは限らない。

【0056】

本明細書で使用されているように、用語「減少する」または、関連する用語「減少した」「低下する」あるいは「低下した」は、統計的に有意な減少を指す。誤解を避けるために、この用語は、一般的に、所定のパラメーターの少なくとも10%の減少のことを言い、少なくとも20%の減少、30%の減少、40%の減少、50%の減少、60%の減少、70%の減少、80%の減少、90%の減少、95%の減少、97%減少、99%または100%の減少（すなわち、測定されたパラメーターはゼロである）を包含することができる。

【0057】

本明細書で使用されているように、幹細胞を記載されたために使用される用語「発達する」「分化する」および「成熟する」は、少なくとも2つの異なる細胞の分化系列へと分化する可能性がある段階から、特定化され、最終的に分化した細胞になるまでの細胞の進行のことを言う。そのような用語は、本出願の目的のために互換的に使用することができる。

【0058】

本明細書に使用されるように、用語「発現」は、宿主細胞内のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳を指す。宿主細胞における所望の生成の発現レベルは、細胞中に存在する対応mRNAの量か、選択された配列によってエンコードされる所望のポリペプチドの量のいずれかに基づいて、決定されてもよい。例えば、選択された配列から転写されるmRNAの量は、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、リボヌクレアーゼRNA保護、細胞のRNAへの、または、PCRによるインサイツハイブリダイゼーションによって定量化可能である。選択された配列によってエンコードされたタンパク質は、例えば、

E L I S A、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、免疫沈殿、タンパク質の生物活性のアッセイ、または、F A C S分析をあとに伴うタンパク質の免疫染色を含むが、これらに限定されない様々な方法によって、定量化可能である。

【0059】

「発現制御配列」は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化信号、ターミネーター、内部リボソーム侵入部位（IRES）などのような、宿主細胞内のコード配列の発現を提供するDNA調節配列である。典型的な発現制御配列は、Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990)に記載されている。

10

【0060】

用語「フィーダー細胞」は、インビトロで成長し、少なくとも1つの因子を培地に分泌し、さらに、培養中の所望の別の細胞の成長を維持するために使用することができる、細胞の培養のことを言う。本明細書で使用されているように、「フィーダー細胞層」は、用語「フィーダー細胞」と互換的に使用することができる。フィーダー細胞は単層を含むことができ、フィーダー細胞は、単層と完全な層の互いの上に成長する前に完全な層で培養皿の表面を覆い、または、フィーダー細胞は2つの細胞のクラスターを含むことができる。

【0061】

用語「成長段階」は、細胞培養に細胞が一定の割合で分裂している、指数関数的な細胞増殖（対数期）の期間を指す。この段階中に、細胞は一定期間のあいだ、かつ、細胞増殖が最大化されるのと同じ条件下で、培養されている。宿主細胞用の成長周期の決定は、必要以上の実験を必要とせず想定された特定の宿主細胞について測定されることができる。「一定時間、かつ、細胞増殖が最大化されるのと同じ条件下で」などは、特定の株化細胞について、細胞の増殖と分裂に最適なように決定される培養条件のことを指す。成長段階のあいだ、細胞は、最適な成長が特定の株化細胞、例えば、哺乳動物細胞について達成されるように、湿らされた、制御された雰囲気下で、通常約30-40°Cで、一般的には約37°Cで、必要な添加剤を含有している培養液中で培養されている。

20

【0062】

用語「相同性」は、遺伝子またはタンパク質を類似する機能またはモチーフで特定するために使用される、配列類似性の数学的に基づく比較を記載している。例えば、他のファミリーメンバー、関連する配列または相同体を同定するための公のデータベースに対して検索を行なうために、本発明の核酸およびタンパク質配列は、「クエリー配列」として使用することができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTとXBLASTのプログラムを用いて行なうことができる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で行うことで、本発明の核酸分子に相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて行なうことができる。比較する目的でギャップアライメントを得るために、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res 25 (17): 3389-3402に記載されるように、ギャップアライメントが利用されてもよい。BLASTおよびギャップBLASTプログラムを利用する際、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTとBLAST）のデフォルトのパラメーターを使用することができる。

30

40

【0063】

用語「相同の(homologous)」は、動物の異なる種からの相同タンパク質と同様に、同じ種の動物におけるスーパーファミリー（例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー）からのタンパク質を含む、「共通の進化的起源」を有する2つのタンパク質間の関係性を指す（例えば、ミオシン軽鎖ポリペプチドなど。Reeck et al., C

50

e11, 50:667, 1987を参照)。そのようなタンパク質（および、それらのエンコード核酸）は、百分率同一性の観点から、または、特定の残基またはモチーフの存在、および、保存部位によってであろうとなかろうと、それらの配列類似性によって反映されるように、配列類似性を有する。

【0064】

成長因子という用語は、アンフィレギュリン、アンギオポエチン、ベタセルリン（骨形態形成タンパク質-13、骨形態形成タンパク質-14、骨形態形成タンパク質-2、ヒトBMP-3、骨形態形成タンパク質-4、ヒトBMP-5、骨形態形成タンパク質-6、骨形態形成タンパク質-7、ヒトCD135リガンド/Flt-3リガンド、ヒト顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、ヒトCrypt-1、ヒトCTGF（結合組織成長因子）、ヒトEGF（上皮増殖因子）、ヒトEGF-VEGF（内分泌腺由来の血管内皮成長因子）、ヒトエリスロポエチン（EPO）、ヒトFGF（繊維芽細胞増殖因子1-23）、ヒトGDF-11、ヒトGDF-15、ヒトGDF-8、ヒト成長ホルモン放出因子（GHRF、GRF、GHRH、成長ホルモン放出ホルモン）、ヒトヘパリン結合上皮増殖因子（HB-EGF）、ヒト肝細胞増殖因子（HGF）、ヒトヘレグリン β 1、ヒトインスリン、ヒトIGF-1（インスリン様成長因子-1）、ヒトIGF-2（インスリン様成長因子-2）、ヒトIGFBP-1（インスリン様成長因子結合タンパク質1）、ヒトIGFBP-3（インスリン様成長因子結合タンパク質3）、腸トレフォイルファクター（ITF）、ヒトケラチノサイト成長因子1&2、ヒト白血病抑制因子（LIF）、ヒトMSP、ヒトミオスタチン、ヒトミオスタチン、プロ（プロペプチド）、ヒトNRG1、ヒトNGF、ヒトオンコスタチン M、ヒト骨芽細胞特異因子1（OSF-1、プレイオトロフィン）、ヒトPD-ECGF（血小板由来内皮細胞成長因子）、ヒトPDGF、ヒトPIGF、ヒト胎盤増殖因子1（PLGF1）、ヒト胎盤増殖因子2（PLGF2）、ヒトSCGF-a（幹細胞成長因子 α ）、ヒトSCGF-b（幹細胞成長因子 β ）、ヒト幹細胞因子（SCF）/CD117リガンド、ヒトトロポポイエチン（TPO、THPO）、ヒトトランスフォーミング成長因子、ヒトTGF- α （トランスフォーミング成長因子 α 、TGFa）、ヒトTGF- β 1（トランスフォーミング成長因子-beta1、TGfb）、ヒトTGF- β 1.2（トランスフォーミング成長因子-beta1、TGfb）、ヒトTGF- β 2（トランスフォーミング成長因子-beta2、TGfb）、ヒトTGF- β 3（トランスフォーミング成長因子-beta3、TGfb）、ヒトVEGF（血管内皮成長因子）、ヒトVEGF-121、および、ヒトVEGF-165、および、ヒトVEGF-Aのことを言う。

【0065】

本明細書で使用されているように、「同一性」とは、配列適合を最大限にするために、すなわち、ギャップと挿入を考慮して、配列を整列させる際に、2以上の配列の対応する位置での同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を意味する。同一性とは、限定されないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D.,

SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)に記載されるものを含む、既知の方法によって容易に計算可能である。同一性を測定する方法は、試験される配列間の最大の適合を与えるために考案される。さらに、同一性を測定する方法は、好適に入手可能なコンピュータ・プログラム中で成文化されている。2つの配列間の同一性を測定するコンピュータ・プログラム方法は、限定されないが、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) and Altschul et al. Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を含んでいる。BLAST Xプログラムは、NCBIおよび他のソース(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))から入手可能である。よく知られているSmith Watermanアルゴリズムも同一性を測定するために使用することができる。
【0066】

(本明細書で互換的に使用される)用語「免疫グロブリン」または「抗体」は、一般的に、2つの重鎖および2つの軽鎖からなる塩基性の4つのポリペプチド鎖構造を有するタンパク質のことを言い、前記鎖は、例えば、特異的に抗原を結合する能力を有する鎖間ジスルフィド結合によって安定させられる。(本明細書で互換的に使用される)用語「単鎖免疫グロブリン」または「単鎖抗体」は、重鎖と軽鎖からなる2ポリペプチド鎖構造を有するタンパク質のことをいい、前記鎖は、例えば、特異的に抗原を結合する能力を有する鎖間ペプチドリンカーによって安定させられる。用語「ドメイン」は、例えば、β-プリーツシートおよび/または鎖間ジスルフィド結合によって、安定したペプチドループ(例えば、3-4のペプチドループを含む)を含む、重鎖ポリペプチドまたは軽鎖ポリペプチドの球状の領域を指す。ドメインは、「定常」ドメインの場合の様々なクラスメンバー(class members)のドメイン内の配列変異の相対的な欠如、または、「可変」領域の場合の様々なクラスメンバーのドメイン内の有意な変化の相対的な欠如に基づいて、「定常」または「可変の」と本明細書では呼ばれる。抗体またはポリペプチドの「ドメイン」は、当該技術分野では、抗体またはポリペプチドの「領域」と互換的に呼ばれる。抗体軽鎖の「定常」ドメインは、「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「CL」領域、または、「CL」ドメインと互換的に呼ばれる。抗体重鎖の「定常」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域、または、「CH」ドメインと互換的に呼ばれる。抗体軽鎖の「可変」ドメインは、「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「VL」領域、または、「VL」ドメインと交換できて呼ばれる。抗体重鎖の「可変」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「VH」領域、または、「VH」ドメインと互換的に呼ばれる。免疫グロブリンまたは抗体は、モノクローナルか、または、ポリクローナルであってもよく、単量体かポリマーの形態、例えば、五量体の形態で存在するIgM抗体、および/または、単量体か、二量体か、多量体の形態で存在するIgA抗体で存在してもよい。用語「フラグメント」は、インタクトまたは完全な抗体よりも少ないアミノ酸残基を含む、抗体または抗体鎖の一部または部分を指す。フラグメントは、インタクトなまたは完全な抗体あるいは抗体鎖の化学的処理または酵素処理によって得ることができる。フラグメントも組み換え手段によって得ることができる。典型的なフラグメントは、Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc、および/または、Fvのフラグメントを含む。

【0067】

用語「単離された(isolated)」は、本明細書で開示される細胞培養成分または熱ショックタンパク質を記載するために使用される際、その自然環境の成分から特定および単離された、および/または、回収されたタンパク質を意味する。その自然環境の汚

染物質成分は、タンパク質の研究、診断的使用または治療的使用を一般的に妨害する物質であり、酵素、ホルモン、および、他のタンパク質または非タンパク質の溶質を含んでもよい。幾つかの実施形態では、タンパク質は、クーマシーブルー、または、好ましくは銀染色を用いて、非還元条件または還元条件下で、SDS-PAGEによって評価されるように、少なくとも95%の均一性に浄化される。対象の自然環境のタンパク質の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離されたタンパク質は組み換え細胞内にインサイツでタンパク質を含む。しかしながら、一般的に、単離されたタンパク質は、少なくとも1つの精製工程によって準備される。

【0068】

本明細書に使用されるような「マーカー」は、対象細胞の中で異なった形で発現される核酸またはポリペプチド分子である。この文脈では、発現差異は、陽性マーカーについて値の増加を、陰性マーカーについて値の減少を意味する。マーカーの核酸またはポリペプチドの検出可能な値は、対象の細胞が当該技術で既知の様々な方法のいずれかを用いて、特定するとともに他の細胞から識別することが可能となるように、他の細胞と比較して対象細胞内で十分に高いか、または、低い。

【0069】

「膵臓の内分泌腺の分化系列のマーカー」を発現する細胞は、転写因子PDX-1と、以下の転写因子の少なくとも1つについて陽性の遺伝子発現を含む細胞を指す：NGN-3、NRx2.2、NRx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3 β 、MAFA、Pax4、および、Pax6。膵臓の細胞の分化系列に特有のマーカーを発現する細胞は、膵臓の β 細胞を含んでいる。

【0070】

本明細書で使用されるように、「内胚葉分化系列の特徴的なマーカー」を発現する細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞のことを指す：SOX-17、GATA-4、HNF-3 β 、GSC、Cer1、Nodal、FGF8、ブラキュリ、混合物のようなホメオボックスタンパク質、FGF4、CD48、eomesodermin (EOMES)、DKK4、FGF17、GATA-6、CXCR4、CKIT、CD99、または、OTX2。最終的な内胚葉分化系列に特徴的なマーカーを発現する細胞は、原始線条前駆細胞、原始線条細胞、中内胚葉細胞、および、最終的な内胚葉細胞を含んでいる。

【0071】

本発明の方法に由来する多能性マーカーを発現する細胞は、以下からなる群から選択された以下の多能性マーカーの少なくとも1つを発現する：ABCG2、cripto、FoxD3、Connexin43、Connexin45、Oct4、SOX-2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tral-60、および、Tral-81。

【0072】

本明細書で使用されるように、「中胚葉分化系列の特徴的なマーカー」を発現する細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：CD48、eomesodermin (EOMES)、SOX-17、DKK4、HNF-3 β 、GSC、FGF17、GATA-6。

【0073】

本明細書で使用されるように、「外胚葉分化系列の特徴的なマーカー」を発現する細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：BMP-4、ノギン、コーディン、Otx2、FoxJ3、ネスチン、p63/TP73L、 β -IIIチューブリン。

【0074】

本明細書に互換的に使用されるように、「操作可能に (operably, operatively) 結合」という用語は、意図した方法で機能することを可能にする手法で2以上のヌクレオチド配列または配列因子を位置決めすることを指す。幾つかの実施形態に

10

20

30

40

50

において、本発明に係る核酸分子は、組み換えタンパク質をコード化するヌクレオチド配列に操作可能に結合されたクロマチンをオープン（open）にするか、および／または、オープン状態にクロマチンを保持することができる1以上のDNA要素を含む。他の実施形態では、核酸分子は、次のものから選ばれた1つ以上のヌクレオチド配列をさらに含んでもよい：（a）並進運動を増加させることができるヌクレオチド配列；（b）細胞の外側の組み換えタンパク質の分泌を増加させることができるヌクレオチド配列；および（c）mRNAの安定性を増加させることができるヌクレオチド配列。このようなヌクレオチド配列が組み換えタンパク質をコード化するヌクレオチド配列に操作可能に結合される。一般的に、しかしながら必ずというわけではないが、操作可能に結合するヌクレオチド配列は近接しており、必要に応じて、リーディングフレーム内にある。しかしながら、クロマチンをオープンにするか、および／または、クロマチンをオープン状態に保持することができる操作可能に結合されたDNA要素は、組み換えタンパク質をコード化するヌクレオチド配列の上流に位置するのが一般的であるが、該要素は必ずしもそれに隣接していない。様々なヌクレオチド配列の操作可能な結合は、当該技術でよく知られた組み換え方法によって、例えば、PCR方法論を用いて、適切な制限酵素部位（restrictions sites）でのライゲーションによって、または、アニーリングによって、遂行される。適切な制限酵素部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドリinkerまたはアダプターは、従来の実践と一致して使用することができる。

【0075】

本明細書で互換的に使用されるように、用語「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドの多量体形態のことを言う。これらの用語は、一本鎖、二本鎖、または、三本鎖のDNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、DNA-RNAハイブリッド、または、プリンおよびピリミジンの塩基、または、他の天然の、化学的に修正された、生化学的に修正された、非天然の、または、誘導体化された、ヌクレオチド塩基を含むポリマーを含む。ポリヌクレオチドの主鎖（backbone）は、糖およびリン酸基（RNAまたはDNAで一般的に見られるような）、または、修正されたか置換された糖またはリン酸基を含むことができる。加えて、二本鎖のポリヌクレオチドは、適切な条件下で 相補鎖を合成して鎖をアニールするか、または、適切なプライマーを含むDNAポリメラーゼを新規に用いることによって、相補鎖を合成することのいずれかによって、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド生成物から得ることができる。核酸分子は、様々な形態、例えば、遺伝子または遺伝子フラグメント、1以上のエキソン、1以上のイントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクトル、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、および、プライマーの形態をとる。ポリヌクレオチドは、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログのような修飾ヌクレオチド、ウラシル、他の糖、および、フルオロリボース（fluororibose）およびチオアートなどの結合基、ならびに、ヌクレオチド分岐のなどを含んでもよい。本明細書で使用されるように、「DNA」または「ヌクレオチド配列」は、塩基A、T、CおよびGを含むのみでなく、任意のそれらのアナログまたはこれらの塩基の修飾された形態（メチル化されたヌクレオチドなど）、ヌクレオチド間の修飾体（無電荷の結合およびチオアート（thioate）など）、糖アナログの使用、および修飾されたおよび／または代替の主鎖構造（ポリアミドなど）も含む。

【0076】

用語「多能性幹細胞」は、胚、胎児または成体の組織から得られた幹細胞を包含する。1つの好ましい実施形態では、多能性幹細胞は胚性幹細胞である。別の実施形態では、多能性幹細胞は始原生殖細胞などの胎児の幹細胞である。別の実施形態では、多能性幹細胞は成体幹細胞である。

【0077】

本明細書で使用されているように、用語「多能性」は、外胚葉の、内胚葉の、および、

中胚葉の細胞の1つなくとも進化することができる細胞を指す。本明細書に使用されるように、用語「多能性」は、全能性で、かつ、多能性の細胞を含んでいる。本明細書で使用されているように、用語「全能細胞」は、細胞のすべての分化系列に進化することができる細胞を指す。「多能性」という用語は、最終的に分化しない細胞のことを言う。

【0078】

「プロモーター」は、細胞内のRNAポリメラーゼを結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。本明細書で使用されているように、プロモーター配列は、転写開始部位によってその3'末端で結合され、背景を超えて検出可能な値で転写を始めるのに必要な最小の数の塩基または要素を含むために、上流に（5'方向）に伸張する。（ヌクレアーゼS1でマッピングすることにより便利なように定義される）転写開始部位は、RNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク結合ドメイン（共通配列）と同様に、プロモーター配列内でも見つけられる。真核生物プロモーターは、常にではないが、しばしば、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含むことができる。原核生物のプロモーターは、-10および-35の共通配列に加えて、シャイン-ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列を含む。

【0079】

様々な異なるソースからの、構成的プロモーター、誘導プロモーター、および、抑制（repressible）プロモーターを含む、大多数のプロモーターが当該技術でよく知られている。代表的なソースは、例えば、ウイルス、哺乳動物、昆虫、植物、酵母、および、細菌細胞型を含み、これらのソースからの適切なプロモーターは容易に入手可能であるか、または、ネットで、または、例えば、商用のソースか個人的なソースと同様に、ATCCなどの保管所から公に入手可能な配列に基づいて、合成的に作ることができる。プロモーターは一方方向性（すなわち、一方方向で転写を始める）であるか、または、双方方向（すなわち、3'または5'のいずれかの方向で転写を始める）であってもいい。プロモーターの非限定的な例は、例えば、T7細菌発現系、pBAD（araA）細菌発現系、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、イネの胚乳の特異的なグルテリン（Gt1）プロモーター、CaMV35Sウイルスプロモーターを含む。誘導プロモーターは、Tet系、（米国特許第5,464,758号および第5,814,618号）、エクジソン誘導系（the Ecdysone inducible system）（Noet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93 (8): 3346-3351; the T-Rex（商標）system（Invitrogen Carlsbad, CA）, LacSwitch（r）（Stratagene,（カリフォルニア州サンディエゴ））、および、Cre-ER（商標）^Tタモキシフェン誘導リコンビナーゼ系（recombinase system）（Indra et al. Nuc. Acid. Res. (1999) 27 (22): 4324-4327; Nuc. Acid. Res. (2000) 28 (23): e99; 米国特許第7,112,715号；および、Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol. (2005) 308: 123-144）、または、所望の細胞での発現に適した当該技術で既知のプロモーターを含む。

【0080】

用語「対象タンパク質」は、研究、診断または治療の目的に役立つ任意のタンパク質を指す。対象タンパク質は、哺乳動物のタンパク質または非哺乳動物のタンパク質を含んでもよく、随意に受容体またはリガンドを含んでもよい。典型的な対象タンパク質は、限定されないが、レニン；ヒト成長ホルモンとウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク質；アルファ-1-抗トリプシン；インシュリンA鎖；インシュリンB鎖；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子VIIIC、因子IX、組織因子、および、フォン・ウィルブランド因子（von Willebrands因子）などの凝固因子；タンパク質Cのような抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界

10

20

30

40

50

面活性剤 (lung surfactant) ; ウロキナーゼまたはヒトの尿または組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) のようなプラスミノゲン活性化因子 ; ポンベシン ; トロンビン ; 造血成長因子 ; 腫瘍壊死因子- α および- β 、CD40 リガンド、Apo-2 リガンド / TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2、DcR3、OPG、Fas リガンドのような TNF および TNF 受容体 (TNFR) ファミリーのメンバー ; エンケファリナーゼ ; RANTES ; (血小板や T 細胞由来の好酸球走化性物質) ; ヒト・マクロファージ炎症タンパク質 (MIP-1- α) ; ヒト血清アルブミンのような血清アルブミン ; ミュラー管 (Mullerian) 抑制因子 ; リラキシン A 鎖 ; リラキシン B 鎖 ; プロリラキシン (prorelaxin) ; マウスのゴナドトロピン関連ペプチド (gonadotropin-associated peptide) ; β -ラクタマーゼなどの微生物タンパク質 ; デオキシリボヌクレアーゼ ; IgE ; CTLA-4 のような細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 (CTLA) ; インヒビン ; アクチビン ; 血管内皮増殖因子 (VEGF) ; ホルモンまたは成長因子のための受容体 ; プロテイン A または D ; リューマチ因子 ; 骨に由来する向神経性因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5、または、-6 (NT-3、NT-4、NT-5、または、NT-6)、あるいは、NGF- β などの神経成長因子といった神経栄養因子 ; 血小板由来増殖因子 (PDGF) ; aFGF と bFGF のような線維芽細胞成長因子 ; 表皮成長因子 (EGF) ; TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、または、TGF- β 5 を含む TGF- α と TGF- β のようなトランスフォーミング成長因子 (TGF) ; インスリン様成長因子-I および-II (IGF-I および IGF-II) ; des (1-3)-IGF-I (脳 IGF-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質 ; CD3、CD4、CD8、CD19 および CD20 のような CD タンパク質 ; エリトロポイエチン ; 骨誘導因子 ; 抗毒素 ; 骨形成因子 (BMP) ; インターフェロン- α 、- β 、および、- γ のようなインターフェロン ; コロニー刺激因子 (CSF) (例えば、M-CSF、GM-CSF、および、G-CSF) ; トロンボポエチン (TPO) ; 例えば、IL-1 乃至 IL-10 などのインターロイキン (IL) ; スーパーオキシド ; T 細胞受容体 ; 表面膜タンパク質 ; 崩壊促進因子 ; 例えば、AIDS エンベロープ (envelope) の一部のようなウイルス抗原、gp120 ; 輸送タンパク質 ; ホーミング受容体 ; アドレシン ; 調節タンパク質 ; CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4、および、VCAM のようなインテグリン ; HER2、HER3、または、HER4 受容体のような抗原関連腫瘍 ; および、先に列挙したポリペプチドのいずれかの変異体および / またはフラグメント ; 同様に、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20 および CD34 などの、様々なタンパク抗原様の CD タンパク質に対する抗体 ; EGF 受容体、HER2、HER3 または HER4 受容体のような ErbB 受容体ファミリーのメンバー ; LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、および、それらの α または β のいずれかのサブユニット (例えば、抗 CD11a、抗 CD18 または抗 CD11b 抗体) を含む α v/ β 3 インテグリンといった細胞接着分子 ; VEGF のような成長因子 ; IgE ; 血液型抗原 ; flk2 / flt3 受容体 ; 肥満 (OB) 受容体 ; mpl 受容体 ; CTLA-4 ; プロテイン C ; Apo-2 (DR5)、DR4、DcR1、DcR2、DcR3 のような Apo-2 L 受容体 ; および、先に特定された抗体などの変異体および / またはフラグメント、のような分子を含む。本発明の 1 つの実施形態では、対象タンパク質は、Apo-2 リガンド / TRAIL、Fas リガンド、または、TNF アルファなどの、インビトロまたはインビボで、哺乳動物または非哺乳動物の細胞中にそれ自体でアポトーシスを誘発することができるたんぱく質を含むであろう。

【0081】

細胞培養の「生成段階」という用語は、細胞増殖がプラトーに達した期間を指す。生成段階中に、対数の細胞増殖は終了し、タンパク質生成が主要なものである (primary) である。この期間中に、培地は、一般的に、継続的なタンパク質生成を維持し、かつ、所望のタンパク質生成物を達成するために補足される。

【0082】

10

20

30

40

50

用語、「組み換えタンパク質」または「組み換えポリペプチド」は、ポリペプチドを生成する細胞に対して外因性であること、すなわち、異種または異物のポリペプチドを指す。

【0083】

アポトーシスまたは細胞培養の文脈における用語「ストレス」は、下記の任意の組み合わせを含む組織培養のための最適でない条件を指す；毒素の存在、栄養素または成長因子の欠乏または撤回、低酸素、熱応力（好ましい範囲と比較して温度が高すぎるかまたは低すぎる）、細胞間接触の損失、ウイルス感染、浸透圧（好ましい範囲と比較して浸透圧が高すぎるかまたは低すぎる）、酸化ストレス、細胞密度（好ましい範囲と比較して細胞密度が高すぎるかまたは低すぎる）、および、pHストレス（好ましい範囲と比較してpHが高すぎるかまたは低すぎる）。

10

【0084】

用語「形質転換」は、1つ以上の核酸分子の宿主細胞または生物体への転換を指す。宿主細胞へ核酸分子を導入する方法は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、微量注入、陽イオン性脂質を媒介としたトランスフェクション、エレクトロポレーション、スクレップローディング（scrapel loading）、ウイルスまたは他の病原菌を用いたバリスティック導入（ballistic introduction）または感染を含む。「形質転換された」「形質導入された」および「トランスジェニックな」は、組み換えまたは異種の核酸分子（例えば、1以上のDNA構築物またはRNA、または、siRNAのカウンターパート（counterpart））が導入された宿主細胞または生物体を指す。核酸分子は安定的に発現される（すなわち、約3か月間以上、細胞の中で機能的な形態を維持する）か、または、3か月未満のあいだ細胞の中で機能的な形態で不安定的に維持される、すなわち、一時的に発現される。例えば、「転換された」「形質転換体」、および、「遺伝子導入の」細胞は、形質転換工程を経て、異質な核酸を含有する。「非形質転換の」という用語は、形質転換工程を経ていない細胞のことを言う。

20

【0085】

細胞培養の「移行期間」は、生成段階の培養条件が関連する期間を指す。移行期間のあいだ、pH、イオン濃度、および、温度のような環境要因は、成長条件から生成条件へと変化してもよい。

30

【0086】

用語「配列類似性」は、共通の進化起源を共有する、または、共有しない核酸またはアミノ酸の配列の間の同一性または一致の程度を指す（上記のようにReeckらを参照）。しかしながら、一般的な使用法と本願において、「高度に」などの副詞で修飾される際、「相同の」という用語は配列類似性を指してもよく、共通の進化起源に関連付けられても関連付けられなくてもよい。

【0087】

特定の実施形態では、2つの核酸配列は、ヌクレオチドの少なくとも約85%、より好ましくは、少なくとも約90%または少なくとも約95%が、BLAST、FASTA、DNA Strider、CLUSTALなどのように既知の配列比較アルゴリズムによって測定されるように、核酸配列の定義された長さにわたって一致する場合、「ほとんど相同」または「ほとんど同一」である。そのような配列の一例は、本発明の特異遺伝子の対立遺伝子多型または変種である。ほとんど相同の配列は、例えば、その特定の系について定義されたようなストリンジェントな条件下で、例えば、サザンハイブリダイゼーション実験でのハイブリダイゼーションによっても特定されてもよい。

40

【0088】

同様に、本発明の特定の実施形態では、アミノ酸残基の80%以上が同一の場合、または、アミノ酸残基の約90%以上が類似している（すなわち、機能的に同一である）場合、2つのアミノ酸配列は「ほとんど相同で」または「ほとんど類似している」。好ましくは、類似または相同のポリペプチド配列は、例えば、GCG（Genetics Com

50

puter Group, Version 7, ウィスコンシン州マジソン) パイルアッププログラム (pileup program) を用いて、または、上に記載されたプログラムとアルゴリズムのいずれかを用いて、配列比較 (alignment) することによって特定される。プログラムは、デフォルト値: GAP クリエーションペナルティ (gap creation penalty) = $-(1 + 1/\kappa)$ (κ は GAP 伸長ペナルティ (gap extension penalty)), 平均一致 = 1, 平均不一致 = -0.333) の Smith-Waterman のローカルホモロジーアルゴリズム (local homology algorithm) を用いてもよい。

【0089】

本明細書および添付の請求項において使用されるように、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈でマイ核に定められていない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「分子」への言及は、1以上のそのような分子を含んでおり、「試薬」は、1以上のそのような異なる試薬を含んでおり、「抗体」への言及は、1以上のそのような異なる抗体を含んでおり、および、「方法」への言及は、本明細書に記載の方法に関して修正または代替可能な当業者に周知の同等の工程および方法への言及を含んでいる。

【0090】

本発明の実施は、別途定めのない限り、当業者の考え得る範囲内で、化学、分子生物学、微生物学、組み換えDNAおよび免疫学の従来技術を利用し、それらは、当業者の能力の範囲内である。そのような技術は、文献に説明されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); Antibodies: A Laboratory Manual by Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-3, 4-2), 1855. Handbook of Drug Screening, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, N. Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); and Lab Ref: A Handbook of Recipes,

10

20

30

40

50

Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Edited Jane Roskams and Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3を参照。これらの一般的なテキストの各々は参照によって本明細書で組み入れられる。

【0091】

他に特段定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術的および科学的用語は、本発明の属する技術分野における当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法、組成物、試薬、細胞は、本発明の実施または試験で用いることができるが、好ましい方法と材料が本明細書に記載される。特許および特許出願を含む、本明細書に記載されるすべての出版物および引用文は、あたかも各々の個々の公報または引用文が十分に説明されるように本明細書で引用によって組み入れられるように具体的にかつ個々に示されているかのように、そっくりそのまま引用することによって本明細書に組み入れられる。この出願が優先権を主張する任意の特許出願は、出版物と引用文について上に記載された方法でそっくりそのまま本明細書で引用することによって組み込まれる。

10

【0092】

上に議論された出版物は、本願の出願日の前にもっぱらその開示のために提供される。本明細書のいかなることも、本発明が以前の発明のおかげでそのような開示に先行する資格を有していないという承認として解釈されない。

20

【0093】

(I 本発明の補足物を使用するための方法)

請求される補足物が、アポトーシスを予防して組織培養中の細胞の生存率を改善する際に、特に、ストレスに応じて、有意な改善を提供する場合、それは、組織と細胞の培養、および、たんぱく質の生成に関して多種多様な応用例で役立つ。

【0094】

アポトーシスは、特有の細胞形態学と死につながる一連の生化学的事象を含んでいる。これらの変化は、細胞膜非対称または付着の損失、細胞の小胞形成の細胞収縮、核断片化、クロマチン凝縮、および、染色体DNA断片化のような細胞膜に対する変化を含む。

【0095】

アポトーシスの工程は多様な範囲の細胞シグナルによって制御され、これは、細胞外（外因性のインデューサー）または細胞内（内因性のインデューサー）のいずれかで生じてもよい。細胞外のシグナルは毒素、ホルモン、成長因子、一酸化窒素、サイトカインを含んでもよく、それらは組織培地中で異なる程度存在してもよい。これらのシグナルは、アポトーシスに肯定的（すなわち、誘発する）または否定的（すなわち、抑圧する、阻害する、または、勢いを弱める）な影響を与えることもあり、したがって生存率全体に影響することもある。ATP含有量、カルシウム濃度、および、多くのアポトーシス性および抗アポトーシス遺伝子を含む多くの細胞内成分は、アポトーシスを制御するのに役立つ。細胞はストレスに応じて細胞内のアポトーシスシグナル伝達を始めることもあり、それは細胞自殺を引き起こすことがある。組織培養中に遭遇するストレス誘発剤は、例えば、エンドトキシンなどの組織培養成分に関連する毒素、および、プラスチック製品、トランスフェクション試薬（例えば、Lipofectamineおよび類似の脂質ベースのトランスフェクション試薬）、ウイルス形質転換、無血清培養に関連する栄養および成長因子の枯渇、または、例えば、洗剤と電気穿孔によって引き起こされる細胞膜への損傷による高密度培養と細胞内カルシウム濃度の増加とに関連する細胞分化プロトコルの低酸素および酸化ストレスを含む。

30

40

【0096】

細胞死の実際のプロセスが生じる前に、アポトーシスシグナルは、アポトーシス経路の活性化を監視するゲートキーパーとして作用する調節タンパク質を克服しなければならない。インビボでは、細胞がもはや死ぬ必要がない場合、この工程のおかげで、プロセスを

50

止めることができる。制御の2つの主要な機構は特定されて、ミトコンドリアの機能に関連した機構と、アダプタータンパク質を介してアポトーシス機構へとシグナルを伝達するのに直接関与する機構を含んでいるが、複数のタンパク質はこの工程に含まれる。

【0097】

細胞培養条件下で育てられた細胞は、いつもの組織培養手順に関連する細胞ストレスを経験し、上記のように、これは、アポトーシスシグナルを誘発し、アポトーシスに対する細胞の感受性を高める。例えば、無血清培養に関連する栄養の枯渇、バイオリアクター中の高密度成長により関連する酸化ストレス、DNAトランスフェクション試薬に関連する細胞毒性化合物の使用、および、凍結保存に関連する熱ストレスによって、細胞はアポトーシスに突入しやすくなる。細胞がそのようなシグナルから生き残る能力を高めることによって、細胞死に対する細胞の傾倒を防ぐことによって、これらの手順の間に細胞の生存率を改善することが可能であり、それによって、これらの手法の成果およびユーティリティを改善する。

10

【0098】

最近になって、アポトーシスの発症を抑制するか、または、その効果を弱める、真核細胞中の多くの遺伝子が特定されている。これらの遺伝子のいくつかは、細胞中のカスパーゼ依存性アポトーシス経路を阻害し、実際に、抗アポトーシス遺伝子を細胞にトランスフェクトことは、生物学的に要求する条件下で育てられたトランスフェクト細胞の寿命および生産性を長くするのに有用である（米国特許第6,586,206号、米国特許第7,531,327号、米国特許出願第2009/0170165号、米国特許出願第US2009/0181426号）。

20

【0099】

さらに、外因性の熱ショックタンパク質の追加は、場合によっては、様々な条件下で培養中の細胞の生存を改善することが示されている（Novoselova et al., J. Neurochem. 94 597-606 (2005); Tidwell et al., Cell Stress & Chap 9 (1) 88-90 (2004); Guzhova et al., Cell Stress & Chap. 3 (1) 67-77 (1998); Hounenou et al., Cell Stress & Chap 1 (3) 161-166 (1996); Johnson et al., In vitro Cell. Dev. Biol., 29A 807-812 (1993)。

30

【0100】

本発明は、植物由来の組み換え細胞培養成分タンパク質が、培養で育てられた哺乳動物細胞に加えられると、細胞の増殖と生存率を驚くほど高めたという実証に一部基づいている。具体的に、そのような補足物は、培養の生存率の改善、細胞の生存の延長、細胞増殖の改善と、組織培養バイオリアクターから生成される組み換えタンパク質の収量の改善を結果としてもたらす。補足物が活性と安定性の予想外の改善を示すため、それらは、標準の組み換えタンパク質または精製されたタンパク質の使用と比較して、有意な改善をもたらす。

【0101】

本出願で開示される方法は、例えば、細胞の生存率を改善するために、および、培養で成長させた細胞の細胞増殖速度を早める際に、有用である。1つの態様では、本発明の補足物は、細胞培養からの組み換えタンパク質の収量を改善するか高めるのに役立つ。本発明によって提供されるさらなる改善は、以下に詳細に記載される。

40

【0102】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞の細胞増殖を高めるための方法を含む。

【0103】

1つの実施形態では、本発明は、無血清培地への補足物の追加を含む、無血清培地に適応させた細胞の生産性を高めるための方法を含む。

50

【0104】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクター中の培養中の細胞への補足物の追加を含む、バイオリアクター中の乳酸塩の蓄積を減少させるための方法を含む。

【0105】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクター中の培養中の細胞への補足物の追加を含む、バイオリアクター中のグルコースおよび他の砂糖の消費を減少させる方法を含む。

【0106】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクター中の培養中の細胞への補足物の追加を含む、培養の開始からバイオリアクターでの採取までの、タンパク質を生成するのに必要な時間を減らす方法を含む。

10

【0107】

1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクターへの補足物の追加を含む、バイオリアクター中の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0108】

1つの実施形態では、本発明は、無血清培地への補足物の追加を含む、無血清培地条件下で成長させた細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0109】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への補足物の追加を含む、低密度に平板培養した際の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

20

【0110】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への補足物の追加を含む、単細胞クローンから成長させた細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0111】

1つの実施形態では、本発明は、培地に対する補足物の追加を含む、培養で成長させたプライマリー細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0112】

1つの実施形態では、本発明は、トランスフェクションの前、間、後の、細胞培地への補足物の追加を含む、トランスフェクション後の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

30

【0113】

1つの実施形態では、本発明は、凍結保存の前、間、後の、細胞培地への補足物の追加を含む、凍結保存後の細胞の生存率を改善するための方法を含む。

【0114】

1つの実施形態では、本発明は、細胞培地への本発明の補足物の追加を含む、培養で成長させた幹細胞の細胞増殖または生存率の割合を改善するための方法を含む。

【0115】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、細胞培地への本発明の補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の収量を改善するための方法を含む。

40

【0116】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の精製を改善するための方法を含む。

【0117】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物のタンパク質分解を減少させるための方法を含む。

【0118】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1

50

以上の間の、培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の生物活性を改善するための方法を含む。

【0119】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物の安定性を改善するための方法を含む。

【0120】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物のアセンブリを改善するための方法を含む。

10

【0121】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、培地への補足物の追加を含む、培養中の細胞から生成された組み換え生成物のヒトパターンに近いグリコシル化を形成するための方法を含む。

【0122】

1つの実施形態では、本発明は、培養物の成長段階、移行段階、または、生成段階の1以上の間の、培地への組み換えアルブミンを含む補足物の追加を含む、免疫原性の少ない培養中の細胞から生成された組み換え生成物を形成するための方法を含む。

【0123】

これらの方法のいずれかにおいて、本発明の補足物は、培養中（および、発酵中の）の宿主細胞の生存率を増加させることによって、機能的な組み換えタンパク質の収量、純度、生物活性、安定性、および、集合を増加させるために、単純でかつコスト効率の良い方法を提供する。さらに、本発明の補足物は、培地中のアポトーシスを減少または阻害することによって、培地中の有害なプロテアーゼの数または存在を減少させて、タンパク質分解に対して発現された対象のタンパク質を保護することができ、それによって、活性タンパク質の量の増加とインタクトなタンパク質の収量の増加とによってからも明らかなように、生成された対象タンパク質の質を高める。さらに、出願人は、本発明の補足物が、洗剤、重金属および培地成分中に存在するエンドトキシン汚染物のような薬剤の潜在的な有害作用から細胞を保護してもよく、または、トランスフェクションまたは凍結保存中に細胞に導入される毒性の試薬から細胞を保護してもよい。

20

30

【0124】

請求される方法のいずれかにおいて、本発明の補足物は、例えば、培地を変えるか、細胞を継代する（passaging cells）か、または、低密度で細胞を沈着させる（plate out）際に、任意の都合のいい時間に培地に直接加えられるか、または、混合されることができる。随意に、補足物は、細胞培養工程の始め（開始時、0日目）に培地に加えられる。1つの態様では、本発明の補足物は、予期されるストレス事象の前に、例えば、凍結保存、トランスフェクション、または、血清の枯渇などの前に加えられてもよい。

【0125】

別の態様では、補足物は、一般的なアポトーシスの導入が始まる時点よりも前の、細胞の培養の間に、培地に加えられる。例えば、大規模な細胞培養中に、アポトーシスの導入は、培養の3日目または4日目ごろに観察され、したがって、補足物は、3日目または4日目の前に加えられるのが好ましいであろう。随意に、所望の量の補足物が、例えば、全体的な発酵に関して毎日のように、細胞培養にわたって、または、細胞培養のあいだ、加えられる。一例として、5日間の培養について、補足物は、0日目に加えられ、培養が終わるまで、その後24時間ごとに加えられてもよい。

40

【0126】

従って、1つの実施形態では、本発明は、バイオリアクターに本発明の補足物を加えることによって、バイオリアクター内で生成された組み換えタンパク質の収量と質を改善する方法を提供する。1つの実施形態では、バイオリアクターは細菌細胞を含んでもよい。

50

別の態様では、バイオリアクターは酵母菌を含む。別の態様では、バイオリアクターは植物細胞を含む。別の態様では、バイオリアクターは哺乳動物細胞を含む。

【0127】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養物に本発明の補足物を加えることによって、細菌細胞中で生成された組み換えタンパク質の収量と質を改善する方法を提供する。収量を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、細胞培養物に本発明の補足物を加えることによって、酵母菌中で生成された組み換えタンパク質の収量と質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、細胞培養物に本発明の補足物を加えることによって、植物細胞中で生成された組み換えタンパク質の収量と質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、細胞培養物に本発明の補足物を加えることによって、昆虫細胞中で生成された組み換えタンパク質の収量と質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、細胞培養物に本発明の補足物を加えることによって、哺乳動物細胞中で生成された組み換えタンパク質の収量と質を改善する方法を提供する。

10

【0128】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養系の生成段階の収量を増加させて、それによって、細胞培養系の生成段階の前、または、その最中に、細胞培養系に本発明の補足物を加えることによって、バイオリアクターの生産性を増加させる方法を提供する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約10%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約20%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約30%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約40%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約50%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約60%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約70%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約80%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約90%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約100%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約200%増加する。この方法の1つの態様では、生成段階の収量は約500%増加する。

20

【0129】

別の実施形態では、本発明は、対象タンパク質を発現する細胞への本発明の補足物の追加を含む、タンパク質の生成のための正常な成長条件と比較して高い温度で対象タンパク質を生成する方法を提供する。

30

【0130】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養発現系への本発明の補足物の追加を含む、対象の凝集しやすいタンパク質による細胞培養発現系で形成された凝集物の量を減らす方法を提供し、それによってタンパク質の凝集状態は低下する。

【0131】

別の実施形態では、本発明は、細胞への本発明の補足物の追加を含む、組み換えタンパク質の変性と凝集を防ぐことによる、細胞によって発現される対象タンパク質のタンパク質の活性を増加させる方法を提供し、それによって対象タンパク質の特異的な活性が増加する。

【0132】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養発現系への本発明の補足物の追加を含む、凝集しやすい、沈殿を生じさせやすい、またはそれ自体が細胞にとって有毒である細胞培養発現系のタンパク質の発現を改善する方法を提供し、それによって、対象タンパク質の発現は増加する。

40

【0133】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養発現系への本発明の補足物の追加を含む、グリコシル化されたタンパク質のグリコシル化パターンを改善する方法を提供し、それによって、グリコシル化の程度は増加し、および／または、得られるグリコシル化のパターンは、ヒトのようになる。

【0134】

50

これらの方法のいずれかで加えられる補足物の量は、様々な因子、例えば、宿主細胞の型、細胞密度、対象タンパク質の、および、培養条件などに依存するであろう。培地に加えられる補足物の所望の濃度を測定することは、当該技術の範囲内であり、通常的最適化によって、および、余分な実験を行うことなく、実験的に確認することができる。

【0135】

熟練した技術者は、異なる細胞型が本発明の補足物に対して異なる反応の程度を有するという、および、これは、補足物中のHSPの量または型によって、ある程度は決定されるということを容易に理解するであろう。さらに、細胞の異なる密度は、細胞の数の増加を説明するために培養物に加えられたHSPの濃度と同様に、補足物の総量の適切な調節を必要とするであろう。さらに、懸濁培養液中で、または、付着培養物を介して成長させた細胞は、(熱ショックタンパク質)HSPの侵入に利用可能な異なる膜表面領域を有し、異なる反応の速度および程度を示すのが一般的である。それゆえ、アポトーシスの十分な阻害、または、生存率の上昇または細胞の純成長を提供する濃度を選ばなければならない。典型的には、本発明の補足物は、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、約20%、約25%、約30%、約40%、または、約50%Wt/wt、または、wt/体積の最終濃度まで加えられる。

10

【0136】

典型的には、超えてしまうと細胞の生存のさらなる増加が起こらない、補足物の濃度の上限があるのが一般的である。以下の実施例に記載されているように、出願人は、本発明の補足物が、約200mg/Lから約2g/Lまで、または、さらに好ましくは、約200mg/Lから約1000mg/Lまで、さらにより好ましくは、約250から約500mg/Lまでの濃度で細胞培養物に加えられると、アポトーシスを阻害することができるということを発見した。

20

【0137】

(I I. 補足物)

1つの態様において、本発明の補足物は、1つ以上の植物由来の組み換え細胞培養成分を含む。本発明の1つの実施形態では、1つ以上の組み換え細胞培養成分は、アルブミン、ラクトフェリン、または、その混合物から独立して選択される。

30

【0138】

本発明の別の態様では、補足物は、トランスフェリン、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、または、成長因子からなる群から選択された1以上の追加の因子を含んでいる。

【0139】

本発明の別の態様では、成長因子は、インシュリン、表皮成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)1-23、インスリン様増殖因子-1(IGF)、ケラチノサイト成長因子1&2(KGF)、および、白血病抑制因子(LIF)から独立して選ばれる。

【0140】

本発明の補足物の1つの態様では、組み換え細胞培養成分の少なくとも1つは、アルブミンである。別の態様では、アルブミンは約2%未満の凝集アルブミンを含む。別の態様では、アルブミンは約1%未満の凝集アルブミンを含む。

40

【0141】

本発明の補足物の1つの態様では、組み換え細胞培養成分は、アルブミンとラクトフェリンの混合物を含む。別の態様では、アルブミンは約2%未満の凝集アルブミンを含む。別の態様では、アルブミンは約1%未満の凝集アルブミンを含む。

【0142】

別の態様では、本発明の補足物は、組み換えアルブミンと、イネの熱ショックタンパク質を含む。別の態様では、本発明の補足物は、組み換えアルブミンおよびイネのhsp7

50

0 ホモログを含む。1つの態様では、イネの h s p 7 0 ホモログは、H S P 7 0、B i p、および、イネのストロマタンパク質 (s t r o m a l p r o t e i n) を選んだ。

【0143】

1つの実施形態では、本発明の補足物は、h s p の肯定的な影響をさまなければ遮蔽するか阻害する洗剤やエンドトキシンを本質的に含まない、同時精製された組み換えアルブミンおよびイネの h s p s の調製を含む。1つの態様では、本発明の補足物は、約1 E U 未満のエンドトキシンを有しており、前記アルブミンは少なくとも約95%純度である。

【0144】

これらの方法のいずれかにおいて、本発明の補足物は、水溶液中で、細胞培養成分を熱ショックタンパク質と同時精製または混合することによって、調製されてもよい。

【0145】

用語「アルブミン」は、アルブミンのすべての自然発生形態および合形成態を指す。好ましくは、用語「アルブミン」は組み換えアルブミンを指す。1つの態様において、アルブミンは脊椎動物からのものである。1つの態様において、アルブミンは哺乳動物からのものである。さらなる実施形態では、アルブミンは、ヒトのものである。別の態様では、組み換えアルブミンは植物細胞から生成される。1つの特に好ましい実施形態では、組み換えアルブミンは、遺伝子組み換えイネ（オリザ・サティバ）（O r y z a S a t i v a）から生成される。代表的な種およびアルブミンの様々な種のための遺伝子バンクの受入番号は、表D1で以下に列挙される。

【0146】

【表1】

表D1 典型的なアルブミン遺伝子	
種	遺伝子銀行受入番号
ヒト	NP_000468.1
チンパンジー	XP_517233.2
カニス・ループス・ファミリアリス	XP_855557.1
ウシ	NP_851335.1
ハツカネズミ	NP_033784.1
ドブネズミ	NP_599153.1
セキショクヤケイ	NP_990592.1

【0147】

異なる種のアルブミンの組み換え型の生成について、問題の宿主生物体用の遺伝子の核酸配列をコドン最適化する必要があることが理解される。このようなコドン最適化は、問題の宿主生物用の好ましいコドン利用の標準分析、及び標準のDNA合成を介する最適化されたヌクレイン酸の合成によって完了することができる。多くの会社は、サービスごとの個別支払方式のサービスなどを提供し、それは例えば、DNA2.0及びOp eron Technologies. (CA, USA)を含む。

【0148】

アルブミンは、その天然形態で、即ち、自然に現れるように対立遺伝子変異型として存在し得、これは、例えば、トランケーション（例えば、N末端又はC末端又はその両方からの）又は他のアミノ酸の欠失、付加、挿入、置換、又は翻訳後修飾によって、それらのアミノ酸配列が変更し得る。アルブミンの翻訳後修飾及び分解生成物を含む自然発生の化学修飾も、例えば、アルブミンの、ピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解

性、リン酸化、グリコシル化、還元化、酸化、異性化、及び脱アミノ化の変異体を含む、本発明の任意の方法に明確に含まれる。

【0149】

天然又は合成のアルブミン配列のフラグメントはまた、それらが由来するペプチドの望ましい機能特性を有し得、本発明の任意の方法に使用され得る。したがって、本明細書に使用されるような用語「フラグメント」は、フラグメントが全体の分子の生物学的又は治療上有益な活性を保持する場合の、アルブミンのフラグメントを含む。

【0150】

例えば、アルブミンは、銅、亜鉛、カドミウム及びニッケルを含む、多くの生理学的に重要な少なくとも2つの高い親和性を有する多金属結合部位を含む。(Carter et al., *Advances in Protein Chemistry* 45 153-203 (1994); Bai et al., *J. Inorg Biochem* 70 (1) 33-39 (1998), Blindauer et al., *J. Biol. Chem.* 284 (34) 23116-24 (2009); US Patent No. 6,787,636)。痕跡量のこれらの金属がアルブミンの組み換え型の生成において典型的に存在するため、かなりの量のこれらの金属イオンは、タンパク質にキレート化され得る。組み換え型のアルブミンに対する、これらのイオンの結合、及び特にカドミウム及びニッケルの結合は、組織培養成分として細胞に加えられた際の、タンパク質の細胞の毒性に関係する。

【0151】

したがって、1つの態様において、用語アルブミンは、アルブミンの多金属結合部位に関係する1つのアミノ酸又は複数のアミノ酸の欠失を含むアルブミンのフラグメントを包含し得る。1つの態様において、アルブミンのフラグメントは、成熟したタンパク質のN末端に1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失によって引き起こされる。別の態様において、アルブミンは、アルブミンのN末端金属結合部位に関係する任意のアミノ酸の1つ又はそれ以上の欠失又は変異を含み得る。1つの態様において、欠失又は変異されるアミノ酸は、配列5' DAHKSEVAH 3' (配列番号1) から独立して選択される。

【0152】

したがって、本明細書に使用されるような用語「誘導体」は、天然の配列と比較した修飾を有する、アルブミン配列又はそのフラグメントを指す。このような修飾は、1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入及び／又は置換であり得る。これらは、近接してもよいまたは近接しなくてもよい。代表的な変異体は、表D1に挙げられる任意の遺伝子と比較して、1~20、又はより好ましくは1~15、1~10、又は1~5のアミノ酸の置換、挿入及び／又は欠失を含み得る。置換されたアミノ酸は、任意のアミノ酸、特に周知の20の従来のアミノ酸 (Ala (A); Cys (C); Asp (D); Glu (E); Phe (F); Gly (G); His (H); Ile (I); Lys (K); Leu (L); Met (M); Asn (N); Pro (P); Gln (Q); Arg (R); Ser (S); Thr (T); Val (V); Trp (W); 及び Tyr (Y)) の1つであり得る。任意のこのようなアルブミンの変異体又は誘導体は、本発明の任意の方法に使用され得る。

【0153】

従って、本発明のアルブミンは、アルブミンの任意の機能的な結合ドメインにおいてアミノ酸の欠失、挿入又は変異を含み得る。1つの態様において、アルブミンは、アルブミンの結合ドメインの変異を含み得る。1つの態様において、変異した結合ドメインは、米国特許第5,780,593号に概説されるような、アスピリン、ワルファリン、ジアゼパム、ジギトキシン、クロフィブラート (dlofibrate)、イブプロフェン又はAZTの結合、又はBlindauer et al., *J. Biol. Chem.* 284 (34) 23116-24 (2009) において概説されるような多金属結合部位に関係するドメインである。

【0154】

したがって、本発明の任意の方法に使用され得るアルブミンは、天然アルブミンのアミノ酸配列、例えば、表D1に挙げられる任意の天然アルブミンの遺伝子配列に対して、本質的に相同性があるか、又は本質的に類似したアミノ酸配列を有し得る。あるいは、アルブミンは、表D1に挙げられるアルブミンとの、少なくとも30%、好ましくは少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。好ましい実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのアルブミンは、以下に強調して示されるように、成熟した分泌されたヒト血清アルブミン（配列番号2）と少なくとも80%同一である（Swiss-Protein P02768）：

【0155】

【化1】

MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQCPF
EDHVKLNVNEV TEFATCTVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP
ERNECFLQHK DDNPNLPLRV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIAARRH PYFYAPELLF
FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDELRL DEGKASSAKQ RLKCSLQKF GERAFAKAWAV
ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLLK
ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYEYAR
RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIKQNCLEFE
QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV
LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNRRP CFSALVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL
SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCCKADDKET CFAEEGKKLV
AASQAALGL (配列番号2)

【0156】

他のタンパク質に対するアルブミンの融合タンパク質も含まれ、これらの融合タンパク質は、活性、ターゲッティング、安定性又は効能を高め得る。

【0157】

アルブミンの活性又は生物学的な半減期を保持又は安定させる天然アルブミン構造の化学修飾はまた、本明細書に記載される任意の方法と共に使用され得る。このような化学修飾の方策は、限定されないが、ペグ化、グリコシル化、及びアシル化を含み（Clark et al. : J. Biol. Chem. 271 (36) : 21969-21977, 1996; Roberts et al. : Adv. Drug. Deliv. Rev. 54 (4) : 459-476, (2002); Felix et al. : Int. J. Pept. Protein. Res. 46 (3-4) : 253-264, (1995); Garber Diabetes Obes. Metab. 7 (6) 666-74 (2005)を参照）、C末端及びN末端の保護基及びペプチド模倣のユニットもまた含まれ得る。

【0158】

天然のLアミノ酸の異性体、例えば、D-アミノ酸は、アルブミンの任意の上記の形態に組み入れられ得、本発明の任意の方法に使用される。アルブミンのこのような変異体、誘導体、融合タンパク質、又はフラグメントが全て含まれ、本明細書の方法の請求項のいずれかに使用され得るか、又は開示され得、用語「アルブミン」のもと包含される。

【0159】

用語「トランスフェリン」は、トランスフェリンのすべての自然発生及び合成の形態を指す。1つの態様において、用語「トランスフェリン」は、組み換え型のトランスフェリンを指す。1つの態様において、トランスフェリンは、脊椎動物からのものである。1つの態様において、トランスフェリンは、哺乳動物からのものである。さらなる実施形態に

10

20

30

40

50

において、トランスフェリンは、ヒトからのものである。別の態様において、組み換え型のトランスフェリンは、植物細胞から生成される。1つの特に好ましい実施形態において、組み換え型のトランスフェリンは、トランスジェニックイネ（イネ属）から生成される。様々な種のトランスフェリンに関する代表的な種及び遺伝子バンク受入番号は、表D2において以下に挙げられる。

【0160】

【表2】

表D2 典型的なトランスフェリン遺伝子	
種	遺伝子銀行受入番号
ホモサピエンス	NP_001054.1
カニス・ループス・ファミリアリス	XP_864550.1
ウシ	NP_803450.2
ハツカネズミ	NP_598738.1
ドブネズミ	NP_001013128.1
セキショクヤケイ	NP_990635.1
ゼブラフィッシュ	NP_001015057.1

10

20

【0161】

トランスフェリンは、その天然形態で、即ち、自然に現れるように異なるapo形態、又は対立遺伝子変異型として存在し得、これは、例えば、トランケーション（例えば、N末端又はC末端又はその両方からの）又は他のアミノ酸の欠失、付加、挿入、置換、又は翻訳後修飾によって、それらのアミノ酸配列が変更し得る。トランスフェリンの翻訳後修飾及び分解生成物を含む自然発生の化学修飾も、例えば、トランスフェリンの、ピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解性、リン酸化、グリコシル化、還元化、酸化、異性化、及び脱アミノ化の変異体を含む、本発明の任意の方法に明確に含まれる。

30

【0162】

本発明の任意の方法に使用され得るトランスフェリンは、天然トランスフェリンのアミノ酸配列、例えば、表D2に挙げられる任意の天然トランスフェリンの遺伝子配列に対して、本質的に相同性があるか、又は本質的に類似したアミノ酸配列を有し得る。あるいは、トランスフェリンは、表D2に挙げられるトランスフェリンとの、少なくとも30%、好ましくは少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。好ましい実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのトランスフェリンは、成熟したヒトトランスフェリンと少なくとも80%同一である。

40

【0163】

用語「グルタチオンS-トランスフェラーゼ」は、グルタチオンS-トランスフェラーゼのすべての自然発生及び合成の形態を指す。1つの態様において、用語「グルタチオンS-トランスフェラーゼ」は、組み換え型のグルタチオンS-トランスフェラーゼを指す。1つの態様において、グルタチオンS-トランスフェラーゼは、脊椎動物からのものである。1つの態様において、グルタチオンS-トランスフェラーゼは、哺乳動物からのものである。さらなる実施形態において、グルタチオンS-トランスフェラーゼは、ヒトからのものである。別の態様において、組み換え型のグルタチオンS-トランスフェラーゼは、植物細胞から生成される。1つの特に好ましい実施形態において、組み換え型のグルタチ

50

オンS-トランスフェラーゼは、トランスジェニックイネ（イネ属）から生成される。様々な種のグルタチオンS-トランスフェラーゼに関する代表的な種及び遺伝子バンク受入番号は、表D3において以下に挙げられる。

【0164】

【表3】

表D3 典型的なグルタチオンSトランスフェラーゼ遺伝子	
種	遺伝子銀行受入番号
ホモサピエンス	<u>NP_004519.1</u>
チンパンジー	<u>XP_001174621.1</u>
カニス・ループス・ファミリアリス	<u>XP_536147.1</u>
カニス・ループス・ファミリアリス	<u>XP_851330.1</u>
ウシ	<u>NP_001030218.1</u>
ハツカネズミ	<u>NP_079845.1</u>
ドブネズミ	<u>XP_213943.2</u>
セキショクヤケイ	<u>XP_001232860.1</u>
ゼブラフィッシュ	<u>NP_998592.1</u>
シロイヌナズナ	<u>NP_176758.1</u>
イネ	<u>NP_001051042.1</u>

【0165】

グルタチオンS-トランスフェラーゼは、その天然形態で、即ち、自然に現れるように異なるa p o形態、又は対立遺伝子変異型として存在し得、これは、例えば、トランケーション（例えば、N末端又はC末端又はその両方からの）又は他のアミノ酸の欠失、付加、挿入、置換、又は翻訳後修飾によって、それらのアミノ酸配列が変更し得る。グルタチオンS-トランスフェラーゼの翻訳後修飾及び分解生成物を含む自然発生の化学修飾も、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼの、ピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解性、リン酸化、グリコシル化、還元化、酸化、異性化、及び脱アミノ化の変異体を含む、本発明の任意の方法に明確に含まれる。本発明の任意の方法に使用され得るグルタチオンS-トランスフェラーゼは、天然のグルタチオンS-トランスフェラーゼのアミノ酸配列、例えば、表D2に挙げられる任意の天然のグルタチオンS-トランスフェラーゼの遺伝子配列に対して、本質的に相同性があるか、又は本質的に類似したアミノ酸配列を有し得る。あるいは、グルタチオンS-トランスフェラーゼは、表D2に挙げられるグルタチオンS-トランスフェラーゼとの、少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。好ましい実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのグルタチオンS-トランスフェラーゼは、成熟したヒトのグルタチオンS-トランスフェラーゼと少なくとも80%同一である。

【0166】

10

20

30

40

50

用語「超過酸化物不均化酵素」は、超過酸化物不均化酵素のすべての自然発生及び合成の形態を指す。1つの態様において、用語「超過酸化物不均化酵素」は、組み換え型の超過酸化物不均化酵素を指す。1つの態様において、超過酸化物不均化酵素は、脊椎動物からのものである。1つの態様において、超過酸化物不均化酵素は、哺乳動物からのものである。さらなる実施形態において、超過酸化物不均化酵素は、ヒからのものである。別の態様において、組み換え型の超過酸化物不均化酵素は、植物細胞から生成される。1つの特に好ましい実施形態において、組み換え型の超過酸化物不均化酵素は、トランスジェニックイネ（イネ属）から生成される。様々な種の超過酸化物不均化酵素に関する代表的な種及び遺伝子バンク受入番号は、表D4において以下に挙げられる。

【0167】

【表4-1】

表D4 典型的な超過酸化物不均化酵素遺伝子	
種	遺伝子銀行受入番号
ホモサピエンス	NP_000445.1
チンパンジー	NP_001009025.1
カニス・ループス・ファミリアリス	NP_001003035.1
ウシ	XP_584414.4
ウシ	NP_777040.1
ハツカネズミ	NP_035564.1
ハツカネズミ	XP_994787.1
ドブネズミ	NP_058746.1
セキショクヤケイ	NP_990395.1
ゼブラフィッシュ	NP_571369.1
キイロショウジョウバエ	NP_476735.1
アノフェレス-ガンビエ	XP_311594.2
シノラブデイス・エレガンス	NP_494779.1

【0168】

【表 4 - 2】

シノラブディス・エレガンス	NP_001021956.1
シゾサッカロミセス・ボンベ	NP_593163.1
サッカロマイセス・セレピン	NP_012638.1
クリペロマイセス・ラクティス	XP_454197.1
エリモセシウム・ゴシッピ	NP_986346.1
マグナポルテ・グリセア	XP_366549.2
アカパンカビ	XP_329323.1
シロイヌナズナ	NP_001077494.1
イネ	NP_001050118.1
イネ	NP_001060564.1

10

【0169】

20

超過酸化物不均化酵素は、その天然形態で、即ち、自然に現れるように異なる a p o 形態、又は対立遺伝子変異型として存在し得、これは、例えば、トランケーション（例えば、N 末端又は C 末端又はその両方からの）又は他のアミノ酸の欠失、付加、挿入、置換、又は翻訳後修飾によって、それらのアミノ酸配列が変更し得る。超過酸化物不均化酵素の翻訳後修飾及び分解生成物を含む自然発生の化学修飾も、例えば、超過酸化物不均化酵素の、ピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解性、リン酸化、グリコシル化、還元化、酸化、異性化、及び脱アミノ化の変異体を含む、本発明の任意の方法に明確に含まれる。本発明の任意の方法に使用され得る超過酸化物不均化酵素は、天然の超過酸化物不均化酵素のアミノ酸配列、例えば、表 D 4 に挙げられる任意の天然の超過酸化物不均化酵素の遺伝子配列に対して、本質的に相同性があるか、又は本質的に類似したアミノ酸配列を有し得る。あるいは、超過酸化物不均化酵素は、表 D 4 に挙げられる超過酸化物不均化酵素との、少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、又は 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。好ましい実施形態において、本発明の任意の方法に使用するための超過酸化物不均化酵素は、成熟したヒトの超過酸化物不均化酵素と少なくとも 80 % 同一である。

30

【0170】

用語「ラクトフェリン」は、ラクトフェリンのすべての自然発生及び合成の形態を指す。1つの態様において、用語「ラクトフェリン」は、組み換え型のラクトフェリンを指す。1つの態様において、ラクトフェリンは、脊椎動物からのものである。1つの態様において、ラクトフェリンは、哺乳動物からのものである。さらなる実施形態において、ラクトフェリンは、ヒトからのものである。別の態様において、組み換え型のラクトフェリンは、植物細胞から生成される。1つの特に好ましい実施形態において、組み換え型のラクトフェリンは、トランスジェニックイネ（イネ属）から生成される。様々な種のラクトフェリンに関する代表的な種及び遺伝子バンク受入番号は、表 D 5 において以下に挙げられる。

40

【0171】

【表 5】

表D5 典型的なラクトフェリン遺伝子	
種	遺伝子銀行受入番号
ホモサピエンス	AAA59511.1
イノシシ	AAA31059.1
ヒトコブラクダ	CAB53387.1
ウシ	AAA30610.1
ウマ	CAA09407.1

10

【0172】

ラクトフェリンは、その天然形態で、即ち、自然に現れるように異なる a p o 形態、又は対立遺伝子変異型として存在し得、これは、例えば、トランケーション（例えば、N 末端又は C 末端又はその両方からの）又は他のアミノ酸の欠失、付加、挿入、置換、又は翻訳後修飾によって、それらのアミノ酸配列が変更し得る。ラクトフェリンの翻訳後修飾及び分解生成物を含む自然発生の化学修飾も、例えば、ラクトフェリンの、ピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解性、リン酸化、グリコシル化、還元化、酸化、異性化、及び脱アミノ化の変異体を含む、本発明の任意の方法に明確に含まれる。本発明の任意の方法に使用され得るラクトフェリンは、天然のラクトフェリンのアミノ酸配列、例えば、表 D 5 に挙げられる任意の天然のラクトフェリンの遺伝子配列に対して、本質的に相同性があるか、又は本質的に類似したアミノ酸配列を有し得る。あるいは、ラクトフェリンは、表 D 5 に挙げられるラクトフェリンとの、少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、又は 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。好ましい実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのラクトフェリンは、成熟したヒトのラクトフェリンと少なくとも 80 % 同一である。

20

30

【0173】

1 つの態様において、本発明の補足は、分離した細胞培養成分を、水溶液中の 1 つ又はそれ以上の熱ショックタンパク質の精製した、又は半精製した調製物と混合することによって調製され得る。このような熱ショックタンパク質は、細胞培養成分対 h s p が、約 1 : 1、約 1 : 10、約 1 : 20 ごろ、約 1 : 50、約 1 : 100、約 1 : 200、約 1 : 500、約 1 : 1000、又は約 1 : 10, 000 のモル比で典型的に混合される。1 つの態様において、細胞培養成分と 1 つ又はそれ以上の熱ショックタンパク質の混合物は、数分から一晩の範囲の間、約 4 °C から 25 °C で水性緩衝液中と一緒にインキュベートされ得る。別の態様において、細胞培養成分と 1 つ又はそれ以上の熱ショックタンパク質の混合物は、数分から一晩の範囲の間、約 20 °C から 37 °C で水性緩衝液中と一緒にインキュベートされ得る。1 つの態様において、細胞培養成分と h s p が A T P がある状態で混合され得ることで、h s p は、細胞培養成分に結合する A T P 依存性の構造を受けることができる。これらの方法のいずれか 1 つの態様において、水性緩衝液は、約 7.5 に対して約 6.5 の p H を有する。これらの方法のいずれかの別の態様において、水性緩衝液は、リン酸塩、T R I S、H E P E S、及び酢酸塩から選択される緩衝液を含む。これらの方法のいずれか 1 つの態様において、細胞培養成分と熱ショックタンパク質の複合体は分離される。

40

【0174】

50

請求される方法のいずれか1つの態様において、細胞培養成分はアルブミンである。請求される方法のいずれか1つの態様において、細胞培養成分はラクトフェリンである。請求される方法のいずれか1つの態様において、細胞培養成分はトランスフェリンである。請求される方法のいずれか1つの態様において、細胞培養成分はヒト成長因子である。

【0175】

細胞培養成分に対しておよそ0.01wt/wt%から0.5wt/wt%のhspを含有する比率を得るために、既知濃度の液体も、1つの構成部分A（アルブミン又は別の細胞培養成分）を含んで、構成成分B（熱ショックタンパク質など）を含む液体に組み合わされ得る。細胞培養成分に対して0.01~0.05%のHspでHspの乾重量に基づいた比率を得るために、粉碎されたか、凍結乾燥されたか、又はそうでなければ乾燥された粉末（Hsp）は、細胞培養成分を含む水溶液に直接加えられ得る。重量測定に完全にに基づく比率を得るために、粉碎されたか、凍結乾燥されたか、又はそうでなければ乾燥されたHspはまた、重量対重量の方式で細胞培養成分の粉末と混合され得る。結果として生じる粉末は、当該技術分野に共通の適切な緩衝液中に、非常に低い濃度（ピコモル）から非常に高い濃度（ミリモル）までの範囲の濃度で溶解され得、細胞培養成分/hspの複合体を再構成する。

【0176】

1つの態様において、従って、本発明の補足は、アルブミン及び1つ又はそれ以上の熱ショックタンパク質を含む。このような補足は、無菌の液体又は粉末形態として一般に調製される。組成物中のhspの合計の量は、細胞培養成分の重量の1%~0.001%の間で変化し得る。他の態様において、組成物中のhspの量は、約0.01%から約0.02%まで、又は約0.01%~約0.09%、又は約0.02%~約0.04%、又は約0.02%~約0.06%、又は約0.02%~約0.08%の間で変化し得る。別の態様において、組成物中のhspの量は、細胞培養成分に対して、約0.02%より多い、又はより好ましくは、約0.03%より多い、又はより好ましくは、約0.04wt/wt%より多い、又はより好ましくは、約0.05wt/wt%のhspより多い。

【0177】

請求される補足のいずれか1つの態様において、補足は、エンドトキシン及び界面活性剤が実質的にない。別の態様において、補足は、約1EU/mg未満のエンドトキシンを有する。また別の態様において、補足は、約10ppm未満の界面活性剤を含む。請求される補足のいずれかの別の態様において、細胞培養成分は、95%より高い純度を有する。

【0178】

請求される補足のいずれかの別の態様において、補足は、イネの熱ショックタンパク質に結合される組み換え型のアルブミンを含み、その複合体は、約1EU未満のエンドトキシンを有し、少なくとも95%の純粋である。1つの態様において、組み換え型のアルブミンは、イネにおいて生成される。

【0179】

これらの方法のいずれかの別の態様において、補足は、細胞培養成分としてアルブミンを含み、アルブミンは凝集アルブミンが本質的にない。これらの補足のいずれかの別の態様において、アルブミンは、約2%未満の凝集アルブミンを有する。

【0180】

(III. 典型的な熱ショックタンパク質)

用語「熱ショックタンパク質」、「HSP」又は「hsp」は、本明細書に使用されるように、抗アポトーシス活性を保持する、熱ショックタンパク質スーパーファミリーのすべての自然発生及び合成の形態を含む。このような熱ショックタンパク質は、小さな熱ショックタンパク質/HSPBファミリー、Hsp40/DnaJファミリー、HSP70/HSPAファミリー、HSP90/HSPCファミリー、HSP110/HSPHファミリー及びシャペロン(chaperone)ファミリーの他に、これらに由来する、ペプチドフラグメント及び2つ又はそれ以上の熱ショックタンパク質又はヌクレオチド

交換因子のタンパク質複合体（例えば、HSP70及びHSP40の複合体）を含む。

【0181】

大多数の異なる種からの熱ショック遺伝子が配列決定されており、少なくとも部分的に機能して交換可能であることが当該技術分野に公知である。したがって、イネの熱ショックタンパク質よりも、ファミリー又は種又は遺伝子からの熱ショックタンパク質である変異体を選択することがルーチンのこととなる。熱ショックタンパク質のいくつかのこのような変異体（すなわち代表的な熱ショックタンパク質）は、表D6～D8に示される。

【0182】

熱ショックタンパク質は、熱及び他のストレスに適応することが必要なストレス応答タンパク質であると元々認識された。その直後、すべてのHSPファミリーはまた、HSP70ファミリーにおけるHsc70（HSPA8）のような構成的に発現されたメンバーをコード化することが明らかとなった。最も広範囲に研究されてきた熱ショック遺伝子（及びそれらがコード化するタンパク質ファミリー）は、HSP70i（HSPA1A/B）、HSP40（DNAJB1）およびHSP27（HSPB1）などのように熱誘導可能な遺伝子である。熱ショックタンパク質は、1つ種類として、すべての種の中で最も高度に発現された細胞タンパク質である。それらの名称が意味するように、熱ショックタンパク質は、高温によってストレスにさらされた時の細胞を保護する。それらは、ストレスにさらされていない細胞中の合計タンパク質の1～2%を占める。しかしながら、細胞が加熱されるとき、熱ショックタンパク質の割合は、細胞タンパク質の約4～6%まで増加する。

【0183】

多様なHSPファミリーに関してコード化する遺伝子の数は、異なる生物体において広く変化する。例えば、HSPA（HSP70）ファミリーでは、メンバーの数は、大腸菌における3からヒトにおける13まで変化する。進化中の遺伝子複製は、異なる細胞内区画での更なるメンバーの必要性の他に、組織に特異的な発現又は発達上の発現の必要性も恐らく満たした。その上、遺伝子複製は、クライアントの特異性及び／又は処理（client specificity and/or processing）に機能的な多様性を与える。

【0184】

真核生物、原核生物、脊椎動物、無脊椎動物、及び他の植物と同様に他の種からの熱ショックタンパク質のすべてのこのような相同体、オルソログ、及び自然発生のアイソフォームは、検知可能な抗アポトーシスの活性を保持する限り、本発明の任意の方法に含まれる。

【0185】

ヒトゲノムのアノテーション以来、文献中でHspファミリーに関して使用される名称は、無秩序になっており、10までの異なる名称が同じ遺伝子産物に見られ得る。以下の表に使用される呼称は、HUGO Gene Nomenclature Committee（HGNC）によって与えられ、Entrez Gene及びEnsembleなどのデータベース中の基本識別子として使用される系統的な遺伝子記号に基づく。

（Kamanga et al., Cell Stress 7 Chaperone 14 105-111（2009））。

【0186】

ヒトゲノムは、多くの偽遺伝子を除く、HSPAファミリーの13のメンバー（表D6）をコード化する。最も研究された遺伝子は、HSPA1A及びHSPA1Bであり、それらの産物は、2つのアミノ酸によって異なるだけであり、十分に交換可能なタンパク質であると考えられる。HSPA6と共に、これらは最も熱誘導可能なファミリーメンバーである。HSPA7は、長く偽遺伝子であると考えられてきたが、最近の分析は、それがHSPA6に対して高度に相同性がある本当の遺伝子かもしれないことを示唆する。HSPA8は、同系統のHSPAであり、Hsc70（又はHSP73）として以前に指定された。それは不可欠な「ハウスキーピング」HSPAメンバーであり、細胞内膜にわたる

共翻訳的フォールディング及びタンパク質移行に関係する。HSPA1L及びHSPA2は、精巣中の高い発現を有する2つの細胞基質のファミリーである。HSPA9は、ミトコンドリアのハウスキーピングHSPAメンバーである（HSPA9は、モルタリン／mtHSP70／GRP75／PBP74としても知られている）。

【0187】

【表6】

表D6 HSP70スーパーファミリー: HSPA (HSP70)					
	遺伝子名	タンパク質名	旧名	ヒト遺伝子ID	マウス オルトログ ID
HSPA					
1	HSPA1A	HSPA1A	HSP70-1; HSP72; HSPA1	3303	193740
2	HSPA1B	HSPA1B	HSP70-2	3304	15511
3	HSPA1L	HSPA1L	hum70t; hum70t; Hsp-hom	3305	15482
4	HSPA2	HSPA2	熱ショック 70kD タンパク質 -2	3306	15512
5	HSPA5	HSPA5	BIP; GRP78; MIF2	3309	14828
6	HSPA6	HSPA6	熱ショック 70kD タンパク質 6 (HSP70B')	3310	X
7	HSPA7a	HSPA7	熱ショック 70kD タンパク質 7	3311	X
8	HSPA8	HSPA8	HSC70; HSC71; HSP71; HSP73	3312	15481
9	HSPA9	HSPA9	GRP75; HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2	3313	15526
10	HSPA12A	HSPA12A	FLJ13874; KIAA0417	259217	73442
11	HSPA12B	HSPA12B	RP23-32L15.1; 2700081N06Rik	116835	72630
12	HSPA13b	HSPA13	Stch	6782	110920
13	HSPA14	HSPA14	HSP70-4; HSP70L1; MGC131990	51182	50497
a 偽遺伝子として注釈されるが、本当の遺伝子の可能性もある					
b HGNC及び科学団体との協議に基づく					

【0188】

Hsp70ファミリーのメンバーは、熱ストレスと有毒化学物質、特にヒ素、カドミウム、銅、水銀などの重金属によって、強力にアップレギュレートされる。Hsp70は、研究員がショウジョウバエ（ミバエ）のインキュベーション温度を偶然に上げた1960年代に、FM Ritossaによって元々発見された。染色体を検査した時、Ritossaは、1つの、未知のタンパク質の高い遺伝子転写を示す「パフパターン（puffing pattern）」を発見した。これはその後「熱ショック応答」と記載された。

【0189】

Hsp70タンパク質は、新しいタンパク質のフォールディングを誘導することに重要

な役割を果たし、タンパク質の完全性を改善し、部分的に折りたたんだ状態でそれらを安定させることにより、タンパク質の膜透過輸送も助ける。全体的なタンパク質の完全性を改善することに加えて、H s p 7 0 はまた、直接アポトーシスを阻害し、損傷を受けた又は不完全なタンパク質の認識及び処分に関係する。

【0190】

タンパク質フォールディングを高めるH s p 7 0 の中心的な役割と共に、H s p 7 0 の発現はまた、低温保存及びバイオ処理などの日常的な組織培養処理の間に熱ストレス又は酸化ストレスから細胞を保護するために作用し得る。これらのストレスは、タンパク質を破損するために通常作用し、部分的なアンフォールディングを引き起こし、凝集を引き起こす可能性もある。ストレスによって曝露した疎水性の残留物に一時的に結合することによって、H s p 7 0 は、これらの部分的に変性したタンパク質が凝集するのを防ぎ、それらがリフォールディングすることを可能にする。熱ショックの特性である低いA T Pは、H S P 7 0 の持続した結合をさらに強化し、凝集を抑えるH S P の能力を高めるためにさらに作用する。好熱性の嫌気性生物 (T h e r m o t o g a m a r i t i m a) において、H s p 7 0 は、モデルペプチドへの酸化還元感受性の結合を実証し、これは、酸化ストレスに基づいた結合調節の第2様式を示している。

10

【0191】

H s p 7 0 はまた、カスパーゼ3の活性化につながるカスパーゼ9の動員を遮断することによって、アポトーシスを阻害し、C H I P (H s p 7 0 I n t e r a c t i n g P r o t e i n のカルボキシル末端) - E 3 ユビキチンリガーゼとの相互作用によって、損傷を受けた又は不完全なタンパク質の処分に関係することができるようである。

20

【0192】

それ故、H s p 7 0 タンパク質は、タンパク質に対する損傷を防ぐだけでなく、ストレスの多い条件下でプログラム細胞死を直接防ぐためにも作用する。ヒトゲノムはまた、N末端A T PアーゼドメインとC末端ペプチド結合ドメインの間のより長いリンカードメインの存在を除いて、H S P Aメンバーに対する高い相同性を有するH S P のファミリーをコード化する、4つのH S P 1 1 0 (H S P H ; 表D 7) 遺伝子をコード化する。事実、2つのメンバー、H S P A 4 (H S P H 2) 及びH S P A 4 L (H S P H 3) は、E n t r e z G e n e のデータベースにおいてH S P Aメンバーとして以前に命名された。3つの細胞基質のメンバーに加えて、1つのコンパートメントに特異的なH S P Hメンバー (H Y O U 1 / G r p 1 7 0) が、E R, (H S P H 4) に存在する。最近の証拠から、H S P HメンバーがH S P Aファミリーに対するヌクレオチド交換因子であることが示される。

30

【0193】

【表 7】

表D7 HSP Hスーパーファミリー: HSPH (HSP110)					
	遺伝子名	タンパク質名	旧名	ヒト遺伝子 ID	マウス オルトログ ID
1	HSPH1	HSPH1	HSP105	10808	15505
2	HSPH2b	HSPH2	HSPA4; APG-2; HSP110	3308	15525
3	HSPH3b	HSPH3	HSPA4L; APG-1	22824	18415
4	HSPH4b	HSPH4	HYOU1/Grp170; ORP150; HSP12A	10525	12282
a 偽遺伝子として注釈されるが、本当の遺伝子の可能性もある					
b HGNC及び科学団体との協議に基づく					

10

【0194】

請求項のいずれか1つの実施形態において、本発明の補足は、小さな熱ショックタンパク質ファミリーから選択されたH s pを含む。別の態様において、H s pは、H S P 4 0 / D n a Jファミリーメンバーから選択される。別の態様において、H s pは、H S P 7 0ファミリーメンバーから選択される。別の態様において、H s pは、H S P 9 0ファミリーメンバーから選択される。別の態様において、H s pは、H S P 1 1 0ファミリーメンバーから選択される。別の態様において、H s pは、シャペロンファミリーメンバーから選択される。

20

【0195】

請求項のいずれか1つの態様において、本発明の補足は、哺乳動物、昆虫、酵母又は植物細胞に由来するH s pスーパーファミリーメンバーを含む。別の態様において、H s pスーパーファミリーメンバーは、植物細胞に由来する。また別の実施形態において、H S Pスーパーファミリーメンバーは、イネ（イネ属）に由来する。

30

【0196】

これらの請求項のいずれか1つの態様において、本発明の補足は、1つ又はそれ以上の他のタンパク質とのタンパク質複合体において存在するh s pスーパーファミリーメンバーを含む。1つの態様において、H S Pスーパーファミリーメンバーは、ヌクレオチド交換因子の別のH s pスーパーファミリーメンバーと複合される。これらの請求項のいずれかの別の態様において、H s pスーパーファミリーメンバーは、アルブミンに結合される。

【0197】

1つの実施形態において、本発明の補足は、H S P 7 0ファミリーメンバーを含む。1つの態様において、H S P 7 0ファミリーメンバーは、H S P A 1 A（H S P 7 2）、H S P A 8（H s c 7 2）及びH S P A 9（G r p 7 8）から選択される。請求項のいずれか1つの態様において、H S Pスーパーファミリーメンバーは、哺乳動物、昆虫、酵母又は植物細胞に由来する。好ましい態様において、H S Pスーパーファミリーメンバーは、植物細胞に由来する。1つの特に好ましい実施形態において、H S Pスーパーファミリーメンバーは、イネ（イネ属）に由来する。

40

【0198】

請求項のいずれか1つの態様において、本発明の補足は、表D 8からの配列から選択されるH S P 7 0ファミリーメンバーを含む。

【0199】

50

【表 8 - 1】
HSPA1A

表D8 HSPA1 HSP70 遺伝子							
ヒト CAM24989	1	MAKAAAIGID	LGTTYSCVGV	FQHGKGERNV	LIFDLGGGTF	DVSILTIDDG	IFEVKATAGD
	61	THLGGEDFDN	RLVNHFVEEF	KRKHKKDISQ	NKRAVRLRT	ACERAKRTLS	SSTQASLEID
	121	SLFEGIDFYT	SITRARFEEL	CSDLFRSTLE	PVEKALRDAK	LDKAQIHDLV	LVGGSTRIPK
	181	VQKLLQDFFN	GRDLNKSINP	DEAVAYGAAV	QAAILMGDKS	ENVQDLLLLD	VAPLSLGLET
	241	AGGVMTALIK	RNSTIPTKQT	QIFTTYSNQ	PGVLIQVYEG	ERAMTKDNNL	LGRFELSGIP
	301	PAPRGVPQIE	VTFDIDANGI	LNVTATDKST	GKANKITITN	DKGRLSKEEI	ERMVQEAEKY
	361	KADEVQRER	VSAKNALESY	AFNMKSAVED	EGLKGKISEA	DKKKVLDKCQ	EVISWLDANT
	421	LAEKDEFEHK	RKELEQVCNP	IISGLYQGAG	GPGPGGFGAQ	GPKGSGSGSP	TIEEVD
	(配列番号3)						

10

【0200】

【表 8 - 2】

昆虫 NP_524798	1	MPAIGIDLGT	TYSCVGVYQH	GKVEIIANDQ	GNRTTPSYVA	FTDSERLIGD	PAKNQVAMNP
	61	RNTVFDKRL	IGRKYDDPKI	AEDMKHWPFK	VVSDGGKPKI	GVEYKGESKR	FAPEEISSMV
	121	LTKMKETAEA	YLGESITDAV	ITVPAYFNDS	QRQATKDAGH	IAGLNLVRII	NEPTAAALAY
	181	GLDKNLKGER	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	EGSLFEVRST	AGDTHLGGED	FDNRLVTHLA
	241	DEFKRKYKGD	LRSNPRALRR	LRTAAERAKR	TLSSSTEATI	EIDALFEGQD	FYTKVSRARF
	301	EELCADLFRN	TLQPVEKALN	DAKMDKGQIH	DIVLVGGSTR	IPKVQSLQD	FFHGKNNLS
	361	INPDEAVAYG	AAVQAAILSG	DQSGKIQDVL	LVDVAPLSLG	IETAGGVMITK	LIERNCRIPC
	421	KQTKTFSTYA	DNQPGVSIQV	YEGERAMTKD	NNALGTFDLS	GIPPAPRGVP	QIEVTFDLDA
	481	NGILNVSAKE	MSTGKAKNIT	IKNDKGRLSQ	AEIDRMVNEA	EKYADEDEKH	RQRITSRNAL
	541	ESYVFNVKQA	VEQAPAGKLD	EADKNSVLDK	CNDTIRWLDS	NTTAEKEEFD	HKLEELTRHC
	601	SPIMTKMHQQ	GAGAGAGGPG	ANCGQQAGGF	GGYSGPTVEE	VD	
	(配列番号 4)						
酵母 NP_00947 8	1	MSRAVGIDLG	TTYSCVAHFS	NDRVEIIAND	QGNRTTPSYV	AFTDTERLIG	DAAKNQAAIN
	61	PHNTVFDAKR	LIGRKFDDE	VTTDAKHFPF	KVISRDGKPV	VQVEYKGETK	TFTPEEISSM
	121	VLSKMKETA	NYLGTTVNDA	VTVPAYFND	SQRQATKDAG	TIAGMNVLRI	INEPTAAIA
	181	YGLDKKGRAE	HNVLIFDLGG	GTDFVSLLSI	DEGVFEVKAT	AGDTHLGGED	FDNRLVNHHLA
	241	TEFKRKTKKD	ISNNQRSLRR	LRTAAERAKR	ALSSSSQTSI	EIDSLFEGMD	FYTSLTRARF
	301	EELCADLFRS	TLEPVEKVLK	DSKLDKSQID	EIVLVGGSTR	IPKIQKLVS	FFNGKEPNRS
	361	INPDEAVAYG	AAVQAAILTG	DQSTKTQDL	LLDVAPLSLG	IETAGGIMTK	LIPRNSTIPT
	421	KKSETFSTYA	DNQPGVLIQV	FEGERTRTKD	NNLLGKFELS	GIPPAPRGVP	QIDVTFDIDA
	481	NGILNVSALE	KGTGKSNKIT	ITNDKGRLSK	DDIDRMVSEA	EKYRADDERE	AERVQAKNQL
	541	ESYAFTLKNT	INEASFKEKV	GEDDAKRLT	ASQETIDWLD	ASQAASTDEY	KDRQKELEGI
	601	ANPIMTKFYG	AGAGAGPGAG	ESGGFPGSMP	NSGATGGGED	TGPTVEEVD	
	(配列番号 5)						
イネ NP_00106 8540	1	MAGKGEGPAI	GIDLGTITYSC	VGWVQHDRV	IIANDQGNRT	TPSYVGFTDS	ERLIGDAAKN
	61	QVAMNPINTV	FDAKRLIGRR	FSDASVQSDI	KLWPFKVIAG	PGDKPMIVVQ	YKGEKQFAA
	121	EEISSMVLK	MREIAEAYLG	TTIKNAVTV	PAYFNDSQRQ	ATKDAGVIAG	LNVMRIINEP
	181	TAAAIAYGLD	KKATSVGEKN	VLIFDLGGGT	FDVSLLTIEE	GIFEVKATAG	DTHLGGEDFD
	241	NRMVNHVQ	FKRKNKKDIT	GNPRALRRLR	TACERAKRTL	SSTAQTITIEI	DSLYEGIDFY
	301	STITRARFEE	LNMDLFRKCM	EPVEKCLRDA	KMDKSSVHDV	VLVGGSTRIP	RVQQLQDFF
	361	NGKELCKNIN	PDEAVAYGAA	VQAAILSGEG	NEKVQDLLLL	DVTPLSLGLE	TAGGVMTVLI
	421	PRNTTIPTKK	EQVFSTYSN	QPGVLIQVYE	GERTRTRDNN	LLGKFELSGI	PPAPRGVPQI
	481	TVCFDIDANG	ILNVSAEDKT	TGQKNKITIT	NDKGRLSKEE	IEKMQEAEK	YKSEDEEHKK
	541	KVESKNALEN	YAYNMRNTIK	DEKIASKLPA	ADKKKIEDAI	DQAIQWLDGN	QLAEADEFD
	601	KMKELEGICN	PIIAKMYQGA	GADMAGGMDE	DDAPPAGGSG	AGPKIEEVD	
	(配列番号 6)						
イネ Os03g0277 300 NP_00104 9719.11	1	MAGNKGEPAI	IGIDLGTITYS	CVGVWQHDRV	EIIANDQGNR	TTPSYVAFTD	TERLIGDAAK
	61	NQVAMNPNTN	VFDAKRLIGR	RFSDPSVQAD	MMWPFKVVP	GPADKPMIVV	TYKGEKKFS
	121	AEISSMVLK	KMKEIAEAF	STTIKNAVIT	VPAYFNDSQR	QATKDAGVIS	GLNVMRIINE
	181	PTAAAIAYGL	DKKAASSTGEK	NVLIFDLGGG	TFDVSILTIE	EGIFEVKATA	GDTHLGGEDF
	241	DNRMVNHVQ	EFKRKHKKDIT	TGNPRALRRL	RTACERAKRT	LSSTAQTITIE	IDSLYEGIDF
	301	YATITRARFE	ELNMDLFRRC	MEPVEKCLRD	AKMDKAQIHD	VVLVGGSTRI	PKVQQLQDFF
	361	FNGKELCKSI	NPDEAVAYGA	AVQAAILSGE	GNQVRQDLLL	LDVTPLSLGL	ETAGGVMTVL
	421	IPRNTTIPTK	KEQVFSTYSN	NQPGVLIQVY	EGERTRTKDN	NLLGKFELTG	IPPAPRGVPQ
	481	INVTFDIDAN	GILNVSAEDK	TTGKKNKITI	TNDKGRLSKE	EIERMVQEA	KYKAEDQVR
	541	HKVEARNALE	NYAYNMRNTV	RDEKIASKLP	ADKKKIEDAI	IEDAIKWLDG	NQLAEADEFE
	601	DKMKELESLC	NPIISKMYQG	GAGGPAGMDE	DAPNGSAGTG	GGSGAGPKIE	EVD
	(配列番号 7)						

【0201】

【表 8 - 3】

タバコ AAR17080	1	MAGKGEGPAI	GIDLGTITYSC	VGWVQHDRV	IIANDQGNRT	TPSYVGFTDS	ERLIGDAAKN
	61	QVAMNPINTV	FDAKRLIGRR	FSDASVQSDI	KLWPFKVISG	PGDKPMIVVN	YKGEKQFAA
	121	EEISSMVLK	MKEIAEAF	STVKNNAVTV	PAYFNDSQRQ	ATKDAGVISG	LNVMRIINEP
	181	TAAAIAYGLD	KKATSVGEKN	VLIFDLGGGT	FDVSLLTIEE	GIFEVKATAG	DTHLGGEDFD
	241	NRMVNHVQ	FKRKHKKDIT	GNPRALRRLR	TACERAKRTL	SSTAQTITIEI	DSLYEGVDFY
	301	STITRARFEE	LNMDLFRKCM	EPVEKCLRDA	KMDKSTVHDV	VLVGGSTRIP	KVQQLQDFF
	361	NGKELCKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILSGEG	NEKVQDLLLL	DVTPLSLGLE	TAGGVMTVLI
	421	PRNTTIPTKK	EQVFSTYSN	QPGVLIQVYE	GERARTRDNN	LLGKFELSGI	PPAPRGVPQI
	481	TVCFDIDANG	ILNVSAEDKT	TGQKNKITIT	NDKGRLSKEE	IEKMQEAEK	YKADEEHKK
	541	KVEAKNALEN	YAYNMRNTIK	DEKIGSKLSS	DDKKKIEDAI	DQAIWLDN	QLAEADEFE
	601	KMKELESICN	PIIAKMYQGA	GGEAGAPMDD	DAPPAGGSSA	GPKIEEVD	
	(配列番号 8)						

【0202】

10

20

30

40

50

熱ショックタンパク質は、その天然形態で、即ち、機能的に同等な変異体として見られ得る異なる種において自然に現れるように、異なる変異体として存在し得、又はそれらは、その機能的に同等な天然の誘導体であり得、例えば、トランケーション（例えば、N末端又はC末端又はその両方からの）又は他のアミノ酸の欠失、付加、挿入、置換、又は翻訳後修飾によって、それらのアミノ酸配列が変更し得る。H s pの翻訳後修飾及び分解生成物を含む、自然発生の化学的誘導体も、例えば、H s pの、ピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解性、リン酸化、グリコシル化、酸化、異性化、及び脱アミノ化の変異体を含む、本発明の任意の方法に明確に含まれる。

【0203】

タンパク質又はペプチドの配列を、それらの有用な活性を保持しつつ、合成的に修飾することは当業者に公知であり、これは、当該技術分野において標準であり、文献に広く記載される技術、例えば、核酸のランダムな又は部位特異的な変異誘発、開裂、ライゲーションを使用して、又はアミノ酸またはポリペプチド鎖の化学合成または修飾を介して達成され得る。

【0204】

したがって、本明細書に使用されるような用語「誘導体」は、天然の配列と比較した修飾を有する、H S P配列又はそのフラグメントを指す。このような修飾は、1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入及び／又は置換であり得る。これらは、近接してもよいしまたは近接しなくてもよい。代表的な変異体は、表D6からD8に挙げられる任意の遺伝子と比較して、1～100、又はより好ましくは1～50、1～25、又は1～10のアミノ酸の置換、挿入及び／又は欠失を含み得る。置換されたアミノ酸は、任意のアミノ酸、特に周知の20の従来のアミノ酸（Ala（A）； Cys（C）； Asp（D）； Glu（E）； Phe（F）； Gly（G）； His（H）； Ile（I）； Lys（K）； Leu（L）； Met（M）； Asn（N）； Pro（P）； Gln（Q）； Arg（R）； Ser（S）； Thr（T）； Val（V）； Trp（W）；及びTyr（Y））の1つであり得る。任意のこのようなH S Pの変異体又は誘導体は、本発明の任意の方法に使用され得る。

【0205】

したがって、本発明の任意の方法に使用され得るH s pは、天然のH S Pアミノ酸配列、例えば、表D6からD8に挙げられる任意の天然のH S P遺伝子配列に対して、本質的に相同性があるか、又は本質的に類似したアミノ酸配列を有し得る。あるいは、H S Pは、表D6からD8に示される遺伝子のいずれか1つのアミノ酸配列順序との、少なくとも30%、好ましくは少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。1つの実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのH S Pは、表D6から選択される配列と少なくとも80%同一である。別の実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのH S Pは、表D6からD8から選択される配列と少なくとも80%同一である。別の実施形態において、本発明の任意の方法に使用するためのH S Pは、表D8から選択されるH s p a 8遺伝子と少なくとも80%同一である。

【0206】

他のタンパク質に対するH S Pの融合タンパク質も含まれ、これらの融合タンパク質は、H S Pの生物学的活性、ターゲッティング、生物学的生命（biological life）又は安定性を高め得る。

【0207】

H S Pの活性又は生物学的な半減期を保持又は安定させる天然のH S P構造の化学修飾はまた、本明細書に記載される任意の方法と共に使用され得る。このような化学修飾の方策は、限定されないが、ペグ化、グリコシル化、及びアシル化を含み（Clark et al. : J. Biol. Chem. 271(36) : 21969-21977, 1996 ; Roberts et al. : Adv. Drug. Deli

10

20

30

40

50

v. Rev. 54 (4) : 459-476, (2002); Felix et al. : Int. J. Pept. Protein. Res. 46 (3-4) : 253-264, (1995); Garber Diabetes Obes. Metab. 7 (6) 666-74 (2005)を参照)、C末端及びN末端の保護基及びペプチド模倣のユニットもまた含まれ得る。

【0208】

天然のLアミノ酸の異性体、例えば、D-アミノ酸は、HSPの任意の上記の形態に組み入れられ得、本発明の任意の方法に使用される。さらなる変異体は、単一または複数のアミノ酸の配列間 (intrasequence) 挿入のみでなく、アミノ末端及び／又はカルボキシル末端の融合も含み得る。より長いペプチドは、HSPペプチド配列の1又はそれ以上の複数コピー (multiple copies) を含み得る。挿入アミノ酸配列の変異体は、1又はそれ以上のアミノ酸残基がタンパク質の1つの部位で導入された変異体である。

【0209】

天然又は合成のHSP配列のフラグメントはまた、それらが由来するペプチドの望ましい機能特性を有し得、本発明の任意の方法に使用され得る。したがって、本明細書に使用されるような用語「フラグメント」は、フラグメントが全体の分子の生物学的又は治療上有益な活性を保持する場合の、HSPのフラグメントを含む。欠失変異体は、配列から1又はそれ以上のアミノ酸の除去によって特徴づけられる。例えば、変異体はまた、自然に、例えば他の種において現れるように、又は地理的変異に起因した、異なる対立遺伝子の変異体を含み得る。HSPのそのような変異体、誘導體、融合タンパク質、又はフラグメントはすべて、本明細書に開示される方法の請求項のいずれかに使用され得、用語「熱ショックタンパク質」又は「hsp」のもと包含される。

【0210】

変異体、誘導體、及びフラグメントは、それらが検知可能な抗アポトーシス活性がある点で機能的に同等である。より具体的には、それらは、HSP70、特にイネHSP70の活性の、少なくとも40%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも80%を示す。したがって、それらは、アルブミンにより同時投与された時、抗アポトーシス薬剤として機能することができ、即ち、HSP70自体に取って代わることができる。

【0211】

このような活性は、インビボ又はインビトロのテストシステムに示される生理反応であろうと、又は例えば、酵素アッセイ、細胞増殖アッセイにおいて、又はストレスがある状態での細胞の生存率に対するhspの効果を検査することによる、天然のHSPによって媒介された任意の生物活性又は反応であろうと、天然のイネHSPによって示されるあらゆる活性を意味する。

【0212】

したがって、血清を含まない又は低血清を含む培地に、あるいは自然においてアポトーシス性又は毒性である成分を含む培地に調整され得る、培養中で成長した任意の細胞に適用可能な細胞の生存率及びアポトーシスを決定するために、HSPの活性は、任意の以前に開示された方法を使用して容易に評価され得る。

【0213】

さらに、成長速度は、細胞の定数を多重プレートに平板培養することによって、低血清又は無血清の状態に成長するように調整された使用して、決定され得る。細胞は、利用される細胞、及び組織培養プレートに依存して、異なる密度で播種され得る。例えば、無血清の状態に調整されたハイブリドーマ細胞は、1mLの培地につき 0.5×10^5 の細胞の初期密度で播種され得る。典型的に、細胞は最初に3回洗浄され、アルブミン、候補hsp、グルタチオンSトランスフェラーゼ、超過氧化物不均化酵素、又はトランスフェリンなどの、培養中の成長を支持するのに必要な特定の成分が、10部分 (parts) の液体培地 (例えば、Dulbecco's) 当たり約1部分までのリン酸塩緩衝食塩水中の所

望濃度に加えられる。37℃及び5%のCO₂の成長期の終わりに、細胞は生存率が数えられる。二重標識染色は、生存可能な細胞と生存不可能な細胞の混合物における生存率を測定するための好ましい方法である。細胞の総数に対して生細胞の数を測定する好ましい方法（パーセント生存率）は、当該技術分野に共通の、細胞を数える装置を使用することである。利用され得る他の方法は、二重標識フローサイトメトリー、あるいは顕微鏡を利用し、トリパンブルーで染色された細胞の手集計、及び細胞を数えるデバイスを含む。実験サンプルの生存率及び細胞数は、陰性対照、実験因子を除いた培地成分、及び陽性対照（ウシ胎児血清又は成分を支持する他の既知の細胞培養）と比較される。一般に、計算の統計的有意差は、反復試験サンプルの信号対雑音比の他に、陽性対照及び陰性対照と比較した、観察される違い又は違いの欠如にも基づいて測定されなければならない。当業者にとって、無血清の成長を可能にする安定した細胞プラットフォームが確立されなければならないことを考慮して、対照に対する生存率の20%の変化は、反復試験サンプルに対する信号対雑音比を提供し、およそ95%の信頼度で有意差を有すると考えられる。

10

【0214】

潜在的な因子のパフォーマンスも、内因性の又は故意に発現されたタンパク質の生成を含む生産性の指標に従って測定され得るか、あるいはアポトーシスの指標に応じて測定され得る。アポトーシスアッセイは、多数あり、DNA断片化及び核分解などの細胞の上流の変化に依存する。下流のアッセイは、カスパーゼ3のようなアポトーシス経路成分などの活性の測定に依存する。以前の方法で調整されるような培養細胞もまた、細胞培養に成分を加える効果を測定する市販のアポトーシスアッセイによってアッセイされ得る。

20

【0215】

（IV．組織成分の生成）

本発明の補足に使用されるアルブミン及び他のタンパク質因子は、任意の適切な方法、例えば、自然発生のソースから、発現系を含む遺伝的に操作された宿主細胞からの分離によって（以下を参照）、又は、例えば、自動化したペプチド合成機、又はそのような方法の任意の組み合わせを使用した化学合成によって調整され得る。このようなポリペプチドを調製するための手段は、当該技術分野においてよく理解される。

【0216】

組み換え型の生成に関して、宿主細胞は、培養成分及び／又は対象のhspをコード化するヌクレイン酸を組み込むために、遺伝子的に操作され得る。典型的に、ヌクレイン酸は、選択の発現系において高レベルの発現のためにコドン最適化され、発現ベクターへ組み込まれることで、宿主細胞において対象のタンパク質の発現が可能となる。ベクターは、環状の二本鎖のDNAとして存在し得、数千ベース（kb）から何百ものkbのサイズの範囲になり得る。ポリヌクレオチド配列のクローニングおよび組み換え型の操作を促進するために、好ましいクローニングベクターは、自然発生のプラスミドから修飾されてきた。多くのこのようなベクターは、当該技術分野に周知であり、市販で入手可能である；例えば、Sambrook（In. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)), Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980)を参照。

30

40

【0217】

1つの態様において、発現ベクターは、宿主細胞中の培養成分の発現を増加させるために使用され、一方で、宿主細胞の内因性の熱ショックタンパク質の発現は、宿主細胞遺伝子の発現を活性化することで達成される。別の態様において、発現ベクターは、熱ショックタンパク質の発現を増加させるために使用される。別の態様において、発現ベクターは、熱ショックタンパク質及び細胞培養成分の発現を増加させるために使用される。別の態

50

様において、熱ショックタンパク質及び細胞培養成分をコード化する核酸配列は、同じ発現ベクターに位置する。

【0218】

発現ベクターは、プラスミド、エピソーム、コスミドレトロウイルス又はファージを含み；発現ベクターは、細胞培養成分又はhspをコード化するDNA配列を発現するために使用され得、1つの態様において、発現調節配列のアセンブリを含む。プロモーター及び他の規定上の成分の選択は、意図した宿主細胞に従って変更することができ、多くのこのような成分は、市販で入手可能であり、Invitrogen, (CA, USA)からのGatewayシステムなど、分離された成分から容易に集めることができる。hsp又は組織培養成分のための発現系は、安定した又は一時的な発現系であり得る。

10

【0219】

これらの方法のいずれか1つの態様において、hsp発現は誘導可能であり得、別の態様において、hsp発現は構成的であり得る。hspのための誘導可能な発現系は、アルブミンのための発現ベクターに含まれ得、又は別々の発現系又は発現ベクターに含まれ得る。

【0220】

これらの方法のいずれか1つの態様において、細胞培養成分の発現は誘導可能であり得、別の態様において、hsp発現は構成的であり得る。組織培養成分のための誘導可能な発現系は、hspのための発現ベクターに含まれ得、又は別々の発現系又は発現ベクターに含まれ得る。

20

【0221】

植物細胞からタンパク質を生成するための一般的及び具体的な技術は、以下の特許及び出願から得られ得、それらの各々は、その全体が引用によって本明細書に組み込まれる：

米国特許出願公開番号2003/0172403 ("Plant Transcription Factors and Enhanced Gene Expression")；米国特許第6,991,824号 ("Expression of Human Milk Proteins in Transgenic Plants")；米国特許出願公開番号2003/0221223 ("Human Blood Protein Expressed in Monocot Seeds")；米国特許出願公開番号2004-0078851 ("Production of Human Growth Factors in Monocot Seeds")；米国特許出願公開番号2004/0063617 ("Method of Making an Anti-infective Composition for Treating Oral Infections")；国際出願番号PCT/US2004/041083 ("High-level Expression of Fusion Polypeptides in Plant Seeds Utilizing Seed-Storage Proteins as Fusion Carriers")。植物細胞からタンパク質を生成するための他の一般的及び具体的な技術は、例えば、以下の文献から得られ得、それらの各々は、その全体が引用によって本明細書に組み込まれる：米国特許第5,693,507号、米国特許第5,932,479号、米国特許第6,642,053号、及び米国特許第6,680,426号（各々の発明の名称「Genetic Engineering of Plant Chloroplasts」）；米国特許出願公開番号2005/0066384 ("Site-Targeted Transformation Using Amplification Vectors")；米国特許出願公開番号2005/0221323 ("Amplification Vectors Based on Trans-Splicing")；米国特許出願公開番号2006/0026718 ("Method of Controlling Cellular Processes in Plants")；米国特許出願公開番号2006/0075524 (Method of Controlling A Cellular Process in a Multi-Cellular Organism)；

30

40

50

Marillonnet et al., Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants, Nature Biotech. (2005) 23 (6): 718-723.

【0222】

代表的な市販で入手可能なウイルス発現ベクターは、限定されないが、Crucell, Inc. から利用可能なPer.C6システムなどのアデノウイルスベースの系、InvitrogenからのpLP1などのレンチウイルスベースの系、及びタバコモザイクウイルスなどのレトロウイルスベクターを含む(Lindbo et al., BMC Biotechnol. (2007) 7 52-58)。

10

【0223】

エピゾームの発現ベクターは、宿主細胞において複製することができ、適切な選択圧がある状態で、宿主細胞内の染色体外エピゾームのとして存続する。(例えば、Conese et al., Gene Therapy 11: 1735-1742 (2004)を参照)。代表的な市販のエピゾームの発現ベクターは、限定されないが、Epstein Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) 及びthe Epstein Barr Virus (EBV) の複製開始点(oriP)を利用するエピゾームのプラスミドを含み、具体的な例は、InvitrogenからのベクターpREP4、pCEP4、pREP7を含む。EBVベースのベクターの宿主領域は、EBNA1結合タンパク質2 (EPB2 (Kapoor et al., EMBO. J. 20: 222-230 (2001))、の同時発現を介して実質的に任意の真核細胞型にまで増加され得、InvitrogenからのベクターpcDNA3.1、及びStratageneからのpBK-CMVは、EBNA1及びoriPの代わりにT抗原及びSV40の複製開始点を使用するエピゾームのベクターの限定しない例を表わす。

20

【0224】

統合する発現ベクターは、宿主細胞のDNAへ無作為に統合することができるか、又は組み換え部位を含むことができ、それによって、発現ベクターと宿主細胞染色体の間の特異的な組み換えが可能となる。このような統合する発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性の発現調節配列を利用することができ、所望されるタンパク質の発現が達成される。部位に特異的な方法で統合するベクターの例は、例えば、StratageneからのpExchange-6Core Vectorsにおいて見られるような、Invitrogen (例えばpcDNA (商標) 5/FRT) からのflp-inシステム、又はcre-loxシステムの成分を含む。無作為な方法で宿主細胞染色体へ統合するベクターの例は、例えば、Invitrogenからの(T抗原がない状態で導入された時の) pcDNA3.1、PromegaからのpCI又はpFN10A (ACT) FLEXI (登録商標)を含む。

30

【0225】

あるいは、発現ベクターは、熱ショックタンパク質などの対象の内因性遺伝子の発現を調節するように、細胞内の座位へ強力なプロモーター又はエンハンサー配列を導入し統合するために使用され得る(Capeocchi MR. Nat Rev Genet. (2005); 6 (6): 507-12; Schindehutte et al., Stem Cells (2005); 23 (1): 10-5)。この手法はまた、熱ショックタンパク質などの対象の内因性遺伝子の誘導可能な発現を提供するように、細胞のゲノムDNAにTet-Onプロモーター(米国特許第5,464,758号及び第5,814,618号)などの誘導可能なプロモーターを挿入するために使用され得る。活性化の構造はまた、標的配列を含み、それによって、対象の遺伝子に特異的である所望の座位への活性化する配列の相同的組み換え又は非相同的組み換えを可能にする(例えば、Garcia-Otin & Guillou, Front Biosci. (2006) 11: 1108-36を参照)。あるいは、Cre-ERシステムなどの

40

50

誘導可能なレコンビナーゼシステムは、4-ヒドロキシタモキシフェンがある状態で、遺伝子組み換えを活性化するために使用され得る (Indra et al., Nuc. Acid. Res. (1999) 27 (22): 4324-4327; Nuc. Acid. Res. (2000) 28 (23): e99; 及び米国特許第 7, 112, 715 号)。

【0226】

あるいは、1つの実施形態において、宿主細胞は、対象の hsp を内因的に発現し得るか、又は限定されないが、熱上昇 (heat elevation) などの上に記載される手段によって対象の hsp を発現するために誘発され得る。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) and Sambrook et al., (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989) によって編集された、In. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 第 2 版), Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980) などの、多くの標準的実験マニュアルに記載される方法によって、宿主細胞へ導入され得る。宿主細胞へポリヌクレオチドを導入する典型的な方法は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、トランスフェクション、微量注入、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング (scrape loading)、弾道導入又は感染 (ballistic introduction or infection) を含む。

【0227】

組織培養成分及び熱ショックタンパク質の生成に適切な細胞は、原核細胞、酵母、昆虫細胞、植物発現系及び哺乳動物発現系を含む。これらの一般的なガイドラインの中で、有用な微生物宿主は、限定されないが、バチルス属、エシェリヒア属 (大腸菌など)、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、サルモネラ属、エルウィニア属、バチルスサチリス属、バチルスプレビス属、エシェリヒアコリの様々な菌株 (例えば、HB101、(ATCC NO. 33694) DH5 α 、DH10 及び MC1061 (ATCC NO. 53338)) からの細菌を含む。

【0228】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株もまた、種類ハンゼヌラ属、クルイベロマイセス属、ピチア属、リノスポリジウム属、サッカロミセス属、及びシズサッカロミセス属、及び他の菌類からものを含む、アルブミン及び hsp の発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞は、例えば、サッカロミセスセレビシエ及びピキアパストリスを含む。

【0229】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系は、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kitts et al., Biotechniques, 14: 810-817 (1993); Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4: 564-572 (1993); and Lucklow et al. (J. Virol., 67: 4566-4579 (1993) によって記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9 及び HI5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) を含む。

【0230】

多くの適切な植物発現系は、アルブミン及び hsp の発現に使用され得、それらの植物は、例えば、任意の単子葉植物、又は双子葉植物を含む。適切な単子葉植物は、限定されないが、イネ、大麦、小麦、ライ麦、トウモロコシ、雑穀、ライ小麦、又はモロコシを

含み、イネが好ましい。他の適切な植物は、アラビドプシス、アルファルファ、タバコ、ピーナッツ及び大豆を含む。

【0231】

多くの適切な哺乳動物の宿主細胞もまた、当該技術分野に公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209から利用可能である。例は、限定されないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)(ATCC No. CCL61) CHO DHFR細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4216-4220 (1980))、ヒト胎生腎(HEK) 293又は293T細胞(ATCC No. CRL1573)、又は3T3細胞(ATCC No. CCL92)などの、哺乳動物細胞を含む。形質転換、培養、増幅、スクリーニング及び生成物の生成及び精製のための、適切な哺乳動物の宿主細胞及び方法の選択は、当該技術分野に公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1(ATCC No. CRL1650)及びCOS-7細胞株(ATCC No. CRL1651)、及びCV-1細胞株(ATCC No. CCL70)である。さらに典型的な哺乳動物の宿主細胞は、形質転換細胞株を含む、霊長類細胞株及び齧歯類細胞株を含む。

10

【0232】

無細胞の転写及び翻訳系も、本発明のDNA構築物(又はDNA構築物に由来するRNA)を使用して、このようなタンパク質を生成するために利用され得る。

20

【0233】

したがって、別の態様において、本発明は、培養中の細胞又は組織の生存及び／又は成長を高める能力を有する補足物を生成するための方法を含む。方法は、細胞培養成分及び熱ショックタンパク質の両方の発現に十分な条件下で本発明の宿主細胞を培養する工程、及びアルブミンと熱ショックタンパク質の複合体を回収する工程を含む。

【0234】

本発明の組み換えタンパク質の生成は、当該技術分野に周知のプロセスによって、発現系を含む遺伝的に操作された宿主細胞から調製され得る。したがって、さらなる態様において、本発明は、ポリヌクレオチド、又はアルブミンをコード化するポリヌクレオチドを含む発現系、及びこのような発現系によって遺伝的に操作される宿主細胞、及び組み換え型の技術によるこのようなタンパク質の生成に関係する。1つの実施形態において、宿主細胞は、対象の熱ショックタンパク質を内因的に発現する。

30

【0235】

本発明の補足の発現されたタンパク質の精製が必要な場合において、本発明のタンパク質は、細胞を溶解する前、又は細胞溶解後のいずれかの細胞環境から回収され得る。タンパク質は、硫酸アンモニウム又はエタノールの沈澱、酸抽出、陰イオン又は陽イオンの交換クロマトグラフィー、組み換え型の細胞培養、フォスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって、細胞培養から回収され得るか精製され得る。高速液体クロマトグラフィーも精製のために利用される。

40

【0236】

陰イオン交換クロマトグラフィー及びATPアガロース親和性クロマトグラフィーを含む、熱ショックタンパク質の精製のための方法は、当該技術分野に周知である。(Welch & Feramisco, J. Biol. Chem. 257 (24) 14949-14959; (1982); Welch & Feramisco, Mol. Cell. Biol. 5 (6) 1229-1237 (1985)。タンパク質をリフォールディングするための周知の技術は、ポリペプチドが細胞内の合成、分離及び／又は精製の間に変性されるときに、活性立体配座を再現するために利用され得る。特許、公開された特許出願、及び関連する出版物の調査も、本開示を読む当業者に、アル

50

ブミンを調整し精製するための重要な可能な方法を提供する。例えば、米国特許第4, 075, 197号；第4, 086, 222号；第4, 093, 612号；第4, 097, 473号；第4, 136, 094号；第4, 228, 154号；第5, 250, 662号；第5, 656, 729号；第5, 677, 424号；第5, 710, 253号；第5, 728, 553号；第5, 994, 507号；第6, 001, 974号；第6, 638, 740号；第6, 617, 133号及び第7, 423, 124号は、アルブミンを精製するための様々なプロセスを開示する。1つの態様において、本発明に使用するためのアルブミンは、これらの当業者に認識された上記のプロセスのいずれかを使用して精製され、次に、水溶液中で熱ショックタンパク質と混合される。

【0237】

1つの好ましい態様において、組み換え型のアルブミンは、組み換え型のアルブミン及び熱ショックタンパク質の両方、又はh s pタンパク質の複合体の直接の同時精製を可能にする手順を使用して精製される。1つの態様において、組み換え型のアルブミンは、イネにおいて生成され、熱ショックタンパク質は、内因性のイネの熱ショックタンパク質である。

【0238】

アルブミン及びh s p 70の類似した電気陰性度により、陰イオン交換クロマトグラフィーは、H s p sが豊富なアルブミンを調製するための好ましい方法である。例えば、アルブミン及びH s p 70の両方は、高いpH (7.5及びそれ以上)でのポリペプチド(大きな分子の排除限界及び適切なサイズである(of suitable size))のイオン交換に適しているビーズ上にマウントされた第四級アミン又はジエチルアミノエチルのいずれかから成る樹脂剤によって陰イオン交換カラムに結合する。このような樹脂剤の例は、General Electric (GE) Q Sepharose及びGE DEAE Sepharoseである。それらの類似した電気陰性度により、低いpHの状態(pH 6.5より下)を利用することで、陽イオン交換体上の2つの分子の同時精製も可能となる。このような陽イオン交換体の例は、GE Carboxymethyl Sepharose及びSulfonic acid Sepharoseベースの樹脂剤である。アルブミン及びH s p 70が類似した等電点を有するため、混合モードの樹脂剤も、アルブミン及びH s p 70の同時精製のために利用され得る。H s p 70とアルブミンの両方が、脂肪酸及び他の疎水性の分子に結合することは周知であるため、オクチルセファロース(GE)などの、疎水性がベースの樹脂上でアルブミン及びH s p 70を同時精製することも可能である。H s p 70タンパク質及びアルブミン(65-75 kDa)の類似した大きさにより、2つのタンパク質の同時精製、及び65-75 kDaより高くより低い分子の排除を利用する接線流限外濾過によるH s p 70の濃縮も、同時精製し、それによってアルブミンをh s pによって濃縮するために利用され得る。

【0239】

また、それらの類似した分子量により、大きさに基づいてポリペプチドを分離する任意の方法は、モレキュラーシーブ、ゲル濾過又はサイズ排除クロマトグラフィーのように、アルブミン及びh s p 70を効果的に同時精製するはずである。さらに、疎水性及び電気陰性度又は表面電荷に関するH s p 70及びアルブミンの類似した性質により、それらは多くの条件下で沈殿によって同時精製され得る。これらの条件のいくつかは、硫酸アンモニウムによる沈殿、尿素などの変性剤による沈殿、又は等電点及び溶解度に基づいた沈殿である。

【0240】

また、方法は他のソースからh s p sによりアルブミンを濃縮するのに適用可能である。例えば、天然の血清及びトランスジェニック動物のフィードストック血清に由来するアルブミンに加え、組み換え型の生物体、及び哺乳動物細胞などの脊椎動物細胞、昆虫などの非脊椎動物細胞を含む、原核細胞及び真核細胞の他に、植物、及び酵母などの菌類に基づいた、組織培養系から生成されたアルブミン。

【0241】

(V 典型的な細胞)

理論によって制限されることがなく、アポトーシスに弱い任意の細胞は、本発明の方法に使用され得ることが熟慮され、その細胞は、様々な特殊化の程度を有する、一次細胞、永久増殖細胞、分化細胞、未分化細胞、又は幹細胞などの細胞を含む。特定の実施形態において、本発明の方法に使用される細胞は、対象のタンパク質、例えば、治療上のタンパク質又は抗体をコード化するヌクレオチド配列を含む核酸分子によってトランスフェクトされる。

【0242】

特定の実施形態において、本発明の方法に使用される細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞の例は、限定されないが、例えば、ヒトのB細胞、及びT細胞、及びハイブリドーマなどの、それらの誘導体、及びB細胞又はT細胞のマーカーを発現する細胞、SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) によって形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胎生腎株 (293個又は浮遊培養での成長のためにサブクローン化された293個の細胞、Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977))；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))；CHO-K1細胞 (ATCC CCL-61)、ヒトPER.C6細胞 (Crucell, NV)、マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))；サル腎培養細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa, ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；パッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065)；マウス乳房腫瘍 (MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞；(Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)) MRC5細胞；FS4細胞；NSOマウス骨髄腫細胞 (ECCACC；SIGMA)、及びヒト肝臓癌株 (Hep G2) を含み得る。有用な細胞株のさらなる例は、限定されないが、HT1080細胞 (ATCC CCL 121)、MCF-7乳癌細胞 (ATCC BTH 22)、K-562白血病細胞 (ATCC CCL 243)、KB癌細胞 (ATCC CCL 17)、2780AD卵巣癌細胞 (Van der Blic, A. M. et al., Cancer Res. 48:5927-5932 (1988) を参照)、ラージ細胞 (ATCC CCL 86)、ジャークット細胞 (ATCC TIB 152)、ナマルバ細胞 (ATCC CRL 1432)、HL-60細胞 (ATCC CCL 240)、ダウディ細胞 (ATCC CCL 213)、RPMI 8226細胞 (ATCC CCL 155)、U-937細胞 (ATCC CRL 1593)、ボーズメラノーマ細胞 (ATCC CRL 9607)、WI-38VA13サブライン2R4細胞 (ATCC CCL 75.1)、及びMOLT-4細胞 (ATCC CRL 1582) に加えて、ヒト細胞と別の種の細胞の融合によって生成されたヘテロハイブリドーマ細胞も含む。これら及び他の細胞及び細胞株は、例えば、米国培養菌保存施設 (American Type Culture Collection) (Virginia, USA) から、市販で入手可能である。多くの他の細胞株は、当該技術分野に公知であり、当業者によく知られており、それ故、このような細胞株は、本発明の方法において等しくうまく使用され得る。特定の実施形態において、本発明の方法に使用される細胞は、CHO細胞又はNSO細胞である。ハイブリドーマ及び抗体産生細胞も、本発明の方法に使用され得る。

【0243】

別の実施形態において、本発明の任意の方法に使用される細胞は、幹細胞である。幹細胞は、自己再生する前駆細胞、再生しない前駆細胞、及び最終分化細胞を含む、子孫細胞

を生成するために、それらの自己再生及び分化する単離細胞レベルでの能力によって定義された、未分化細胞である。幹細胞はまた、複数の胚葉（内胚葉、中胚葉及び外胚葉）から様々な細胞系統の機能細胞へとインビトロで分化するそれらの能力の他に、移植に続いて複数の胚葉の組織を生じさせる、及びすべてでないにしても、胚盤胞への注入に続いて組織のほとんどに実質的に寄与するそれらの能力によって特徴付けられる。

【0244】

本発明の任意の方法に使用され得るヒト幹細胞のタイプは、前胚組織（例えば、胚盤胞など）、胚組織、又は妊娠中のいつでも、典型的には、しかし必ずしもではないが、妊娠およそ10-12週未満で得られた胎児組織を含む、妊娠後に形成された組織に由来するヒト細胞の確立した株を含む。限定しない例は、例えばヒト胚性幹細胞株H1、H7、H9（WiCell）などの、ヒト胚性幹細胞又はヒト胚性生殖細胞の確立した株である。また、このような細胞の初期の確立又は安定化の間に本開示の組成物の使用が熟慮され、その場合、ソース細胞は、ソース組織から直接得られた主要な多能性細胞になる。また、血液又は臍帯血から分離された幹細胞が適切である。また、フィーダー細胞がない状態で既に培養された多能性幹細胞の個体群から得られた細胞が適切である。また、例えば、BG01v（BresaGen, Athens, Ga.）などの、突然変異のヒト幹細胞株が適切である。1つの実施形態において、ヒト幹細胞は、Thomson et al.（米国特許第5,843,780号；Science 282:1145, 1998；Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998；Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995）によって記載されるように調製される。

【0245】

さらに、ハイブリドーマ細胞も、本発明の方法に使用され得る。用語「ハイブリドーマ」は、免疫学的起源の不死化細胞株と抗体産生細胞の融合によって生成されたハイブリッド細胞株を指す。該用語は、ヒト細胞と、トリオーマ細胞株として一般に知られる、プラズマ細胞と後に融合されるネズミ骨髓細胞株の融合の結果である、ヘテロハイブリッド骨髓腫融合の後代を包含する。更に、該用語は、例えば、クアドローマなどの抗体を生成する任意の不死化ハイブリッド細胞株を含むように意図される。例えば、Milstein et al., Nature, 537:3053（1983）を参照。ハイブリッド細胞株は、ヒト、ウサギ及びマウスを含む、あらゆる種のハイブリッド細胞株であり得る。

【0246】

幾つかの実施形態において、本発明の方法に使用される細胞株は、抗体産生細胞株である。抗体産生細胞株は、当業者に周知の技術を使用して選択され、培養され得る。例えば、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York（1991）を参照し、その全体が補足を含む引用によって本明細書に組み込まれる。一般に、細胞培養中の組み換えタンパク質発現に適しているあらゆる細胞は、本発明の方法に使用され得る。

【0247】

幾つかの実施形態において、本発明の方法に使用される細胞は、所望の組み換えタンパク質、例えば、本発明の方法を使用して生成されることが所望される、治療上のタンパク質又は抗体をコード化する異種核酸分子を含み得る。特定の実施形態において、本発明の方法は、低下したレベルの1つ又はそれ以上の汚染物質がある状態で、所望の組み換えタンパク質、例えば、治療上のタンパク質又は抗体の高い力価を生み出すのに役立つ。

【0248】

（VI. 細胞培地）

細胞増殖及びタンパク質生成に適している任意の適切な培地又は流加培地は、本発明の方法に使用され得る。適切な培養又は流加培地は、宿主細胞と対象のプロセスとのそれら

の適合性に関して選択される。適切な培養又は流加培地は、当該技術分野に周知であり、限定されないが、Ham's F10 (SIGMA)、Minimal Essential Medium (SIGMA)、RPMI-1640 (SIGMA)、及びダルベッコ変法イーグル培地SIGMAなどの、商用培地を含み、これらは、動物細胞を培養するのに適切である。さらに、Ham and Wallace, (1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes and Sato, (1980) Anal. Biochem. 102:255; U. S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 5,122,469 or 4,560,655; International Publication Nos. WO 90/03430; 及びWO 87/00195に記載される任意の培地が使用され得る。

10

【0249】

任意のこのような培地は、ホルモン及び／又は他の成長因子（インスリン、トランスフェリン、又は表皮増殖因子など）、塩類（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩など）、緩衝液（HEPESなど）、ヌクレオシド（アデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（GENTAMYCIN（商標）など）、痕跡元素（ミクロモルの範囲内の終末濃度で通常存在する無機化合物がとして定義される）、及びグルコース又は同等のエネルギー源とともに必要とされるものとして補足され得る。任意の他の必要な補足物も、当業者に公知の適切な濃度で含まれ得る。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択される宿主細胞とともに以前に使用されたものであり、当業者に明白となる。例えば、Mammalian Cell Culture (Mather, J. P. ed., Plenum Press, N. Y. (1984), 及びBarnes and Sato, Cell, 22:649 (1980)に記載されるように、特定の細胞のための必要な成長因子は、経験的に過度の実験なしで、容易に測定される。

20

【0250】

組み換え型の脊椎動物細胞培養において対象のタンパク質の合成への適応に適した他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantel et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載される。一般に、哺乳動物細胞培養の生産性を最大限にするための、原理、プロトコル、及び実践的技術は、Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)において見出され得る。

30

【0251】

(VII. 典型的な細胞培養発現産物)

請求される方法のいずれか1つの態様において、本発明の補足は、対象のタンパク質を発現し生成するために使用される細胞の生存率及び成長を改善するために使用される。細胞は、対象のタンパク質を内因的に発現し得るか、又はその細胞に関する背景 (background) を超えるレベルで対象のタンパク質を発現するために、遺伝的に修飾されてきた操作された細胞株であり得る。

40

【0252】

細胞はまた、対象のタンパク質をコード化するヌクレイン酸との形質転換によって、又は内因性遺伝子の発現を促進する活性化する配列の形質転換によって、タンパク質を発現するために遺伝的に修飾され得る。1つの態様において、対象のタンパク質は、発現ベクターから発現され得、そこで対象のタンパク質のためのコード配列は、発現調節配列に操作可能に連結されることで、当該技術分野に公知のように、構成的な又は誘導可能な発現のいずれかが可能となる。

【0253】

対象のタンパク質は、任意のタンパク質、又はそのフラグメントであり得、それは、限

50

定されないが、サイトカイン、ケモキネス、ホルモン、抗体、抗酸化分子、操作された免疫グロブリン様の分子、一本鎖抗体、ヒト化抗体、融合タンパク質、酵素、免疫性共刺激性分子、免疫修飾性分子、標的タンパク質のトランス優性ネガティブ変異体、毒素、条件付きの毒素、抗原、腫瘍抑制タンパク質、成長因子、膜タンパク質、血管作動性のタンパク質及びペプチド、抗ウイルスのタンパク質及びリボザイム、及び（関係するレポーター基との）それらの誘導体を含む、治療上又は診断上の価値のあるタンパク質であり得る。対象のタンパク質はまた、プロドラッグ活性化酵素を含み得る。

【0254】

幾つかの実施形態において、対象のタンパク質は、糖タンパク質、又は1つ又はそれ以上の翻訳後修飾を有する他のタンパク質を含む。例えば、真核生物宿主内の生成に適している任意のタンパク質は、本明細書に記載される方法及び組成物を使用して発現され得る。

10

【0255】

本発明の方法は、任意の所望の組み換えタンパク質又はそのフラグメントを生成するために使用され得る。幾つかの実施形態において、本明細書に記載される方法を使用して生成された組み換えタンパク質は、治療上のタンパク質である。他の実施形態において、組み換えタンパク質は、抗体又はその機能性フラグメントである。本発明の方法を使用して生成され得る抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、多特異性抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、ハイブリッド抗体、CDRグラフト化抗体を含む。それは、完全長IgG1抗体、又は例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、及びscfvなどの、その抗原結合性フラグメントを含み得る。

20

【0256】

本発明の範囲内の抗体は、限定されないが、以下を含む：トラスツズマブを含む抗HER2抗体（HERCEPTIN（商標））（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289（1992）, 米国特許第5,725,856号）；米国特許第5,736,137号（RITUXAN（商標））におけるようなキメラ抗CD20「C2B8」、米国特許第5,721,108号におけるような2H7抗体のキメラ又はヒト化の変異体、B1、又はトシツマブ（BEXXAR（商標））などの、抗CD20抗体；抗-IL-8；（St John et al., Chest, 103:932（1993）, 及び国際公開番号WO 95/23865）；ヒト化抗VEGF抗体huA4.6.1 AVASTIN（商標）などの、ヒト化及び／又は親和性が成熟した抗VEGF抗体を含む、抗VEGF抗体（Kim et al., Growth Factors, 7:53-64（1992）, 1998年10月15日に公開された、国際公開番号WO 96/30046、及びWO 98/45331）；抗PSCA抗体（WO 01/40309）；S2C6及びそのヒト化変異体を含む、抗CD40抗体（WO 00/75348）；抗CD11a（米国特許第5,622,700号、WO 98/23761、Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7（1991）, 及びHourmant et al., Transplantation 58:377-380（1994））；抗IgE（Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632（1993）, 及び国際公開番号WO 95/19181）；抗CD18（1997年4月22日に発行された、米国特許第5,622,700号、又は1997年7月31日に公開された、WO 97/26912におけるような）；抗IgE（E25、E26及びE27を含む；1998年2月3日に発行された、米国特許第5,714,338号、又は1992年2月25日に発行された、米国特許第5,091,313号、1993年3月4日に公開された、WO 93/04173、又は1998年6月30日に出版された、国際出版番号PCT/US98/13410、米国特許第5,714,338号）；抗-アポー2受容体抗体（1998年11月19日に公開された、WO 98/51793）；cA2（REMICADE（商標））、CDP571及びMAK-195を含む、抗-TNF-アルファ、抗体（1997年9月30日に発行さ

30

40

50

れた、米国特許第5,672,347号、Lorenz et al. J. Immunol. 156(4):1646-1653 (1996)、及びDhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9):1461-1469 (1995)を参照)；抗組織因子(TF)(1994年11月9日に認可された、欧州特許番号0 420 937 B1)；抗ヒトアルファ4ベータ7インテグリン(1998年2月19日に公開された、WO 98/06248)；抗EGFR(1996年12月19日に公開された、WO 96/40210におけるような、キメラ化又はヒト化の225の抗体)；OKT3などの、抗CD3抗体(1985年5月7日に発行された、米国特許第4,515,893号)；CHI-621などの、抗CD25又は抗tac抗体(SIMULACT(商標))及び(ZENAPAX(商標))(1997年12月2日に発行された、米国特許第5,693,762号を参照)；cM-7412抗体(Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996))などの、抗CD4抗体CAMPATH-1Hなどの、抗CD52抗体(Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988))；Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995)におけるような、FcガンマRIに向けられたM22抗体などの、抗Fc受容体抗体；hMN-14などの、抗癌胚抗原(CEA)抗体(Sharkey et al. Cancer Res. 55(23 Suppl):5935s-5945s (1995))；huBrE-3、hu-mc 3及びCHL6を含む、胸上皮細胞に向けられた抗体(Ceriani et al. Cancer Res. 55(23):5852s-5856s (1995)；及びRichman et al. Cancer Res. 55(23 Suppl):5916s-5920s (1995))；C242(Litton et al. Eur J. Immunol)などの、結腸癌細胞に結合する抗体(Litton et al. Eur J. Immunol. 26(1):1-9 (1996))；抗CD38抗体、例えばAT 13/5(Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937 (1995))；Hu M195などの、抗CD33抗体(Jurcic et al. Cancer Res. 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)及びCMA-676又はCDP771)；LL2又はLymphoCideなどの、抗CD22抗体(Juweid et al. Cancer Res. 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995))；17-1Aなどの、抗EpCAM抗体(PANOREX(商標))；アブシキシマブ又はc7E3 Fabなどの抗GpIIb/IIIa抗体(MEDI-493(SYNAGIS(商標))などの、REOPRO(商標)の抗RSV抗体)；PROTOVIR(商標)などの、抗CMV抗体；PRO542などの、抗HIV抗体；抗Hep B抗体OSTAVIR(商標)などの、抗肝炎抗体；抗CA 125抗体OvaRex；抗イディオタイプのGD3エピトープ抗体BEC2；抗、アルファ、v、ベータ、3抗体VITAXIN(商標)；ch-G250などの、抗ヒト腎細胞癌抗体；ING-1；抗ヒト17-1A抗体(3622W94)；抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体(A33)；GD3ガングリオシドに向けられた抗ヒトメラノーマ抗体R24；抗ヒト扁平上皮癌(SF-25)；及びSmart ID10及び抗HLA DR抗体Oncolym(Lym-1)などの、抗ヒト白血球抗原(HLA)抗体。

本明細書の抗体のための好ましい標的抗原は、HER2受容体、VEGF、IgE、CD20、CD11a、及びCD40である。

【0257】

組み換えタンパク質は、受容体(例えば、膜結合受容体又はサイトゾル受容体)などの細胞タンパク質、又は構造タンパク質(例えば、細胞骨格タンパク質)であり得る。組み換えタンパク質は、細胞によって分泌され得るか、又は1つ又はそれ以上のシグナル伝達経路の内部で使用され得る、細胞性因子であり得る。限定しない例は、限定されないが、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD14、CD18、CD20、CD22、CD23、CD25、CD33、CD40、CD44、CD52、CD80(B7、

1)、CD86(B7.2)、CD147、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-2の受容体、IL-4受容体、IL-6受容体、IL-13受容体、IL-18受容体のサブユニット、PDGF、EGF受容体、VEGF受容体、肝細胞増殖因子、破骨細胞分化抑制因子リガンド、インターフェロンガンマ、Bリンパ球刺激物C5補体TAG-72、インテグリンアルファ4ベータ7、インテグリンVLA-4、B2インテグリン、TRAIL受容体1、2、3、及び4、RANK、RANKリガンド、TNF、接着分子VAP-1、上皮細胞接着分子(EpCAM)、細胞間接着分子-3(ICAM-3)、ロイコインテグリン付着因子、血小板糖タンパク質gpIIB/IIIA、心筋ミオシン重鎖、副甲状腺ホルモン、rNAPc2、及びCTLA4(これは、細胞毒性Tリンパ球に関係する抗原である)を含む。

10

【0258】

組み換えタンパク質はまた、ウイルス、細菌、又は菌類などの伝染因子に由来し得る。例えば、タンパク質は、ウイルスコートに由来し得るか、又はウイルスの酵素又は転写因子であり得る。タンパク質は、細菌膜又は細胞壁に由来し得るか、又は細菌の細胞質ゾルに由来し得る。タンパク質は、酵母酵素、転写因子、又は構造タンパク質であり得る。酵母タンパク質は、膜結合性の、サイトゾルの、又は分泌されたタンパク質であり得る。伝染因子の例は、限定されないが、呼吸器合胞体ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス、ミュータンス連鎖球菌、及び黄色ブドウ球菌、及びカンジダアルビカンスを含む。その上、細胞培養系の生成物は、これらの上記のいずれかなどの、ウイルスであり得る。これらのウイルスは、生ウイルス、弱毒ウイルス、及びさもなければ、非活化ウイルス又はウイルス粒子又はウイルス様粒子などの、その成分を含む。ウイルスはまた、偽型ウイルスであり得、そのウイルスの成分は、2つ又はそれ以上の異なるウイルスの成分から成る。さらに、細胞培養の生成物は、ワクチンであり得る。ワクチンは、本来、治療上又は予防上のワクチンであり得る。培養中で生成されたワクチンは、しばしば、生ウイルス又は弱毒ウイルス又はサブユニットワクチンによって例証されるようなそれらの成分であり得るか、又は1つを超えるウイルスの成分を含む、組み換えウイルス又はウイルス様粒子であり得る。

20

【0259】

本発明の方法はまた、前述のタンパク質のすべて又はいずれかの部分を含む組み換え型の融合タンパク質を生成するために使用され得る。例えば、ロイシンジッパー、多段コイル、抗体のFc部分、又は本質的に類似したタンパク質などの、多量体化のドメインを加えた前述のタンパク質の1つを含む、組み換え型の融合タンパク質は、本発明の方法を使用して生成され得る。例えば、国際出願番号94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Hangkansson et al. (1999), Structure 7:255-64を参照。

30

【0260】

また、本発明によって包含されるのは、本明細書に記載される方法によって生成された1つ又はそれ以上の組み換えタンパク質を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態において、医薬組成物はさらに、薬学的に許容可能な担体を含む。本明細書に使用されるような用語「薬学的に許容可能な担体」は、被験体への投与に適した、1つ又はそれ以上の適合性のある固体又は液体の充填剤、賦形剤、又はカプセル化する物質を意味する。

40

【0261】

(VII 幹細胞)

1つの実施形態において、ヒト幹細胞は、フィーダー細胞が本質的にないが、それでも、実質的な分化を受けることなく、ヒト胚性幹細胞の増殖を支持する培養系において培養され、これは本発明の補足物を含む。分化なしでのフィーダーのない培養中のヒト幹細胞の成長は、別の細胞型とともに前もって培養することによって調整された培地を使用して

50

支持され、これはさらに本発明の補足物を含む。あるいは、分化なしでのフィーダーのない培養中のヒト幹細胞の成長は、本発明の補足物を含む合成培地を使用して支持される。幹細胞が、幹細胞の自己再生を引き起こすことができる異なる成長因子で補足された無条件の血清置換（SR）の培地において維持される、フィーダーのない、無血清培養系の例は、米国特許出願US 20050148070、US 20050244962、US 20050233446、米国特許第6,800,480号、及びPCT公開WO 2005065354及びWO 2005086845に開示されるものを含む。

【0262】

代替の実施形態において、ヒト幹細胞は、ヒト幹細胞を支持するフィーダー細胞の層によって最初に培養され、さらに本発明の補足物を含む。ヒトは、その後、フィーダー細胞が本質的にないが、それでも、実質的な分化を受けることなく、ヒト胚性幹細胞の増殖を支持する培養系に転写され、これはさらに本発明の補足物を含む。これらの手法のいずれかにおいて、本発明の補足物の使用は、細胞増殖の著しく高められた割合及び改善された細胞の生存率という結果をもたらす。

【0263】

本発明の補足物との使用に適した調整培地の例は、US 20020072117、米国特許第6,642,048号、WO 2005014799、及びXu et al. (Stem Cells 22: 972-980, 2004)に開示される。本発明の補足物との使用に適した合成培地の例は、US 20070010011において見出され得る。

【0264】

フィーダー細胞の例は、線維芽細胞、MRC-5細胞、胎生腎細胞、間充織細胞、骨肉腫細胞、角化細胞、軟骨細胞、卵管上皮細胞、肝細胞、心細胞、骨髄間質細胞、顆粒膜細胞、骨格筋細胞、筋細胞及び大動脈内皮細胞から成る群から選択されるフィーダー細胞を含む。好ましい実施形態において、MRC-5細胞は、ATCCカタログ番号55-Xを有し；形質転換され、ATCC受入番号CRL-2309を有し；ヒト骨肉腫細胞は、ATCC受入番号HTB-96を有し；及び間充織細胞は、ATCC受入番号CRL-1486を有するヒト胎児の口蓋間充織細胞である。他の好ましい実施形態において、ヒト線維芽細胞は、皮膚ケロイド線維芽細胞、KELFIBであり、ATCC受入番号CRL-1762を有するか、又は胎児の皮膚線維芽細胞であり；及び骨髄間質細胞、HS-5は、ATCC受入番号CRL-11882を有する。

【0265】

適切な培地は、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）、Gibco #11965-092などの、下記の成分から作られ得る；ノックアウト・ダルベッコ変法イーグル培地（KO DMEM）、Gibco #10829-018；Ham's F12/50% DMEM基本培地；200mMのL-グルタミン、Gibco #15039-027；可欠アミノ酸溶液、Gibco 11140-050； β -メルカプトエタノール、シグマ #M7522；ヒト組み換え型の塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、Gibco #13256-029。

【0266】

1つの実施形態において、ヒト幹細胞は、本発明の方法によって処置前に処置される適切な培養基質上に、本発明の補足物を含む組成物によって平板培養される。1つの実施形態において、処置は、例えば基底膜に由来するものなど、又は接着分子受容体リガンドのカップリングの一部を形成し得る、細胞間マトリックス成分である。1つの実施形態において、適切な培養基質は、MATRIGEL（Becton Dickinson）である。MATRIGELは、再構成された基底膜を形成するために室温でゲル化する、Engelbreth川辺の低地Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍細胞からの可溶性の調製物である。

【0267】

他の細胞間マトリックス成分及び成分の混合物は、代替物として適切であり、本発明の

補足物とともに使用され得る。これは、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパラン硫酸などを単独で、又は本発明の補足物との様々な組み合わせで含み得る。

【0268】

別の実施形態において、本発明は、幹細胞培養を含み、これは、本発明の補足物を含む、ヒト多能性幹細胞、及びフィーダーのない、無血清培養系を含む。1つの実施形態において、本発明は、ヒト多能性幹細胞培養を含み、これは、本発明の補足物を含む、ヒト多能性幹細胞、及びフィーダーのない、無血清培養系を含む。

【0269】

別の実施形態において、本発明は、幹細胞培養を含み、これは、本発明の補足物を含む、ヒト幹細胞及びヒトフィーダー細胞培養を含む。別の実施形態において、本発明は、ヒト多能性幹細胞培養を含み、これは、本発明の補足物を含む、ヒト多能性幹細胞及びヒトフィーダー細胞培養を含む。

【0270】

別の実施形態において、本発明は、多分化能マーカーを発現する細胞を含む細胞の個体群を引き出すための方法を提供し、該方法は：

- a. ヒト幹細胞を培養する工程、
- b. 多分化能マーカーを発現する細胞へとヒト幹細胞を分化する工程を含み、ここで、分化は本発明の補足物がある状態で行われる。

【0271】

別の実施形態において、本発明は、外胚葉、内胚葉又は中胚葉の細胞の特性がある、マーカーを発現する細胞を含む細胞の個体群を引き出すための方法を提供し、該方法は：

- a. 多分化能幹細胞を培養する工程、
- b. 外胚葉、内胚葉又は中胚葉の細胞の特性があるマーカーを発現する細胞へと多分化能幹細胞を分化する工程を含み、ここで、分化は本発明の補足物がある状態で行われる。

【0272】

これらの方法のいずれかにおいて、幹細胞は、当該技術分野における任意の方法によって、内胚葉、外胚葉又は中胚葉の系統の特性があるマーカーを発現する細胞へと分化され得る。例えば、多分化能マーカーを発現する細胞は、D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005), by Shinozaki et al., Development 131, 1651-1662 (2004), McLean et al., Stem Cells 25, 29-38 (2007), D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006)に開示される方法によって、明確な内胚葉系統の特性があるマーカーを発現する細胞に分化され得る。

【0273】

内胚葉系統の特性があるマーカーを発現する細胞はさらに、当該技術分野における任意の方法によって、膵臓の内分泌腺系統の特性があるマーカーを発現する細胞に分化され得る。例えば、膵臓の内胚葉系統の特性があるマーカーを発現する細胞は、D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006)に開示される方法によって、膵臓の内分泌腺系統の特性があるマーカーを発現する細胞に分化され得、ここで、分化は本発明の補足物がある状態で行われる。

【0274】

分化のこれらの方法のいずれか1つの態様において、ヒト幹細胞は、培養され、細胞間マトリックスでコーティングされた組織培養基質上で分化される。細胞間マトリックスは、マウス肉腫細胞から抽出された、可溶性になった基底膜の調製物であり得る（これは、商標名、MATRIGELの下、BD Biosciencesによって販売される）。あるいは、細胞間マトリックスは、成長因子が減少したMATRIGELであり得る。あ

るいは、細胞間マトリックスは、フィブロネクチンであり得る。代替の実施形態において、ヒト幹細胞は、培養され、ヒト血清によってコーティングされた組織培養基質上で分化される。1つの態様において、組織培養基質は、細胞間マトリックス及び本発明の補足物によってコーティングされる。

【0275】

細胞間マトリックスは、組織培養基質をコーティングする前に希釈され得る。細胞間マトリックスを希釈し、組織培養基質をコーティングするための適切な方法の例は、Kleinman, H. K., et al., Biochemistry 25:312 (1986), 及びHadley, M. A., et al., J. Cell Biol. 101:1511 (1985) において見出され得る。

10

【0276】

幹細胞分化の方法の1つの態様において、培地は、特定の因子の十分低い濃度を含むべきであり、それによって、例えば、(WO2006020919に開示されるような)インスリン及びIGFなどの、内胚葉、外胚葉又は中胚葉系統の細胞へのヒト幹細胞の分化が可能となる。これは、血清中濃度を低下させることによって、あるいは、インスリン及びIGFを欠く合成培地を使用することによって達成され得る。合成培地の例は、Wiles et al (Exp Cell Res. 1999 Feb. 25; 247(1): 241-8.) において見出される。これらの方法のいずれかの、好ましい実施形態において、培地は、本発明の補足物を含む。

【0277】

培地はまた、ヒト幹細胞から、内胚葉、中胚葉又は外胚葉系統の特性があるマーカーを発現する細胞の形成を強化し得る、少なくとも1つの他のさらなる因子を含み得る。少なくとも1つのさらなる因子は、例えば、ニコチン酸アミド、TGF- β 1、2、及び3を含む、TGF- β ファミリーのメンバー、血清アルブミン、線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバー、血小板由来増殖因子AA及びBB、多血小板血漿、インスリン成長因子(IGF-I、II)、成長分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、11)、ペプチド-I及びII(GLP-I及びII)のようなグルカゴン、GLP-1及びGLP-2 ミメティボディ(mimetobody)、Exendin-4、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、インスリン、プロゲステロン、アプロチニン、ヒドロコルチゾン、エタノールアミン、ベータメルカプトエタノール、表皮増殖因子(EGF)、ガストリンI及びII、例えば、トリエチレンペンタミンなどの銅のキレート化剤、ホルスコリン、Na酪酸塩、アクチビン、ベタセルリン、ITS、ノギン、神経突起成長因子、結節、バルプロ酸、トリコスタチンA、ナトリウム酪酸塩、肝細胞増殖因子(HGF)、スフィンゴシン1、VEGF、MG132(EMD、CA)、N2及びB27の補足物(Gibco、CA)、例えばシクロパミン(EMD、CA)などの、ステロイドアルカロイド、角化細胞成長因子(KGF)、Dickkopfタンパク質ファミリー、ウシ下垂体抽出物、島ネオゲネシスに関係するタンパク質(INGAP)、インディアンヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、プロテアソーム阻害剤、ノッチ経路インヒビター、ソニックヘッジホッグインヒビター、又はそれらの組み合わせであり得る。これらの方法の、好ましい実施形態において、上に挙げられる少なくとも1つのさらなる因子を含む培地は、本発明の補足物をさらに含む。

20

30

40

【0278】

少なくとも1つの他の追加の因子は、例えばPANC-1(ATCC No:CRL-1469)、CAPAN-1(ATCC No:HTB-79)、BxPC-3(ATCC No:CRL-1687)、HPAF-II(ATCC No:CRL-1997)などの膵臓細胞株、例えばHepG2(ATCC No:HTB-8065)などの肝細胞株、及び例えばFHS 74(ATCC No:CCl-241)などの腸細胞株から得られる、条件培地によって供給されてもよい。これら方法の何れかの好ましい実施形態において、調整培地は本発明の補足物を更に含む。別の実施形態において、本発明は、ヒト又は動物における疾患又は疾病の実験的、治療的及び予防的な処置のため、前述の幹細胞

50

胞の何れかの細胞又は組織を使用する方法を包含する。好ましくは、疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、脊椎損傷、卒中、黄斑変性、熱傷、肝不全、心臓病、糖尿病、デュシェンヌ型筋ジストロフィ、骨形成不全症、骨関節炎、関節リウマチ、貧血症、白血病、乳癌、固形腫瘍、及びエイズから成る群から選択される。好ましい実施形態において、疾患はパーキンソン病又はアルツハイマー病である。より好ましい実施形態において、疾患はパーキンソン病である。

【0279】

(IX. 組み換えタンパク質の大規模生成)

1つの実施形態において、本発明の補足物は、補足物の存在下で宿主細胞を成長させることにより、対象のタンパク質を生成するために使用することができる。1つの実施形態において、細胞培養は攪拌タンク式バイオリアクターシステムで行なわれ、流加培養法の手順が使用される。別の実施形態において、波型の使い捨ての(wave disposable)バイオリアクターが使用される。バイオリアクターシステムにおいて、バイオリアクターのサイズは、1, 000リットル又は12, 000リットルのサイズのように、所望の量の対象のタンパク質を生成するには十分大きい、より小さい(即ち、2リットル、400リットル)又はより大きい(即ち、25, 000リットル、50, 000リットル)バイオリアクター容器が適切であってもよい。このようなサイズに限定されない。好ましい流加培養法において、哺乳動物の宿主細胞及び培地は、培養容器に最初に供給され、追加の培養栄養素は、培養の終了の前の周期性の細胞及び／又は生成物収集と共に又はそれら無しで、培養中の培養物に、継続的に又は別々の増加量で、供給される。流加培養法は、例えば、半連続的な流加培養法を含むことができ、ここで、周期的に全体の培養物(細胞と培地を含む)が取り除かれ、新しい培地と交換される。流加培養法は、細胞培養のための全ての成分(細胞及びすべての培養栄養素を含む)が、培養プロセスの初めに培養容器に供給される単純な回分培養と区別される。流加培養法は、上澄みがプロセス中ではなく培養プロセスの終わりに培養容器から取り除かれる限り、灌流培養と更に区別することができる(灌流培養において、細胞は、例えば濾過、カプセル化、マイクロキャリアへの固定などにより培養において抑制され、培地は、継続的に又は断続的に導入され、培養容器から取り除かれる)。

【0280】

更に、培養細胞は、特定の宿主細胞及び熟慮される特定の生成計画に適している、任意のスキーム又はルーチンに従って繁殖されてもよい。それ故、本発明は単一の工程又は複数の工程の培養手順を熟慮する。単一の工程の培養において、宿主細胞は培養環境に播種され、本発明の方法の工程は、細胞培養の単一の生成段階中に使用される。代わりに、複数段階の培養が予見される。複数段階の培養において、細胞は多くの工程又は段階で培養されてもよい。例えば、細胞は、最初の工程又は成長段階の培養において成長してもよく、ここで細胞は、恐らく貯蔵から取り除かれ、成長及び高い生存率を促進するのに適切な本発明の補足物を含む培地に播種される。細胞は、宿主細胞培養に新しい培地を追加することによって、適切な期間の間、成長段階のまま維持されてもよい。

【0281】

本発明の好ましい態様によると、流加回分又は連続的な細胞培養条件は、細胞培養の成長段階において哺乳動物細胞の成長を高めるために考案される。成長段階において、細胞は、前記条件下で、成長のため最大限にされる期間の間成長する。温度、pH、溶解酸素(dO_2)などのような培養条件は、特定の宿主と共に使用されるものであり、通常の当業者に明らかとなるだろう。一般に、pHは、酸(例えば CO_2)又は塩基(例えば Na_2CO_3 又は $NaOH$)のいずれかを使用して、約6.5と7.5の間のレベルに調節される。 CHO 細胞などの哺乳動物細胞の培養に適切な温度範囲は、約 $30^{\circ}C$ から $38^{\circ}C$ の間であり、好ましくは約 $37^{\circ}C$ であり、適切な dO_2 は空気飽和の5-90%の間にある。

【0282】

特定の段階で、細胞は生成段階又は細胞培養の工程で播種するために使用されてもよい

。あるいは、上述のように、生成段階又は工程は、播種又は成長段階或いは工程と連続していてもよい。

【0283】

本発明によると、細胞培養の生成段階中の細胞培養環境は制御される。現在開示された方法の工程によると、本発明の補足物の追加は調和することができ、その結果、対象のタンパク質の所望の含有量及び品質が、結果として生じる細胞培養液において達成され、維持される。好ましい態様において、細胞培養の生成段階は、本発明の補足物の追加が細胞培養の生成段階を開始する細胞培養の転換段階によって始まる。

【0284】

上記方法のいずれかにおいて、本発明の補足物と組み合わせた細胞培地中で、ブチラート又はトリコスタチンAのような所望の量の薬剤を含むのが望ましくなることが熟慮される。ブチラートとその塩の様々な形態は、酪酸及び酪酸ナトリウムなどのように、当該技術分野において知られており、Sigma Chemical Co等の供給源から公的に利用可能である。ブチラートは、細胞培養の生成性及びタンパク質発現を高めるため、文献で報告されている[Arts et al., Biochem J., 310: 171-176 (1995); Gorman et al., Nucleic Acids Res., 11: 7631-7648 (1983); Krugh, Mol. Cell. Biochem., 42: 65-82 (1982); Lamotte et al., Cytotechnology, 29: 55-64 (1999); Chotigeat et al., Cytotechnology, 15: 217-221 (1994)]。トリコスタチンA(TSA)は、ヒストンデアセチラーゼの阻害剤であり、細胞培養における生成性及びタンパク質発現を高める際、ブチラートにも同様に作用してもよい[Medina et al., Cancer Research, 57: 3697-3707 (1997)]。ブチラートはタンパク質発現に対するいくつかの陽性の効果を有するが、一定の濃度で、ブチラートが培養細胞においてアポトーシスを誘発し、それにより生細胞密度と同様に培養の生存率を減少することができることも、当該技術分野において認識される[Hague et al., Int. J. Cancer, 55: 498-505 (1993); Calabresse et al., Biochim. Biophys. Res. Comm., 195: 31-38 (1993); Fillipovich et al., Biochim. Biophys. Res. Comm., 198: 257-265 (1994); Medina et al., Cancer Research, 57: 3697-3707 (1997)]。本発明の方法において、所望の量のブチラート又はTSAは、生成段階の始めに細胞培養に加えられてもよく、及びより好ましくは、温度シフトが実施された後、細胞培養に加えられてもよい。ブチラート又はTSAは、当業者により経験に基づいて測定される所望の量に加えることができるが、好ましくは、ブチラートは、約1から約25mMの濃度で細胞培養に加えられ、及びより好ましくは、約1から約6mMの濃度で加えられる。

【0285】

対象のタンパク質の発現は、適切に標識化されたプローブを使用して、例えば、ELISA、従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)]、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、サンプル中で直接測定されてもよい。様々な標識が利用されてもよく、最も一般には放射性同位元素、及び特に³²Pが利用されてもよい。しかしながら、他の技術も、ポリヌクレオチドへの導入のためビオチン修飾したヌクレオチドを使用するように利用されてもよい。その後ビオチンは、アビジン又は抗体に結合するための部位として役立ち、それはラジオヌクレオチド(radionucleotides)、蛍光体又は酵素などの多種多様の標識により標識化されてもよい。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本

10

20

30

40

50

鎖を含む、特異的な二本鎖を認識することができる抗体が利用されてもよい。抗体は次々に標識化されてもよく、アッセイは二本鎖が表面に結合される場合に実行されてもよく、その結果、表面上での二本鎖の形成に際し、二本鎖に結合する抗体の存在を検出することができる。

【0286】

遺伝子発現は代わりに、遺伝子産物の発現を直接定量化するため、細胞培養又は体液の細胞又は組織部分及びアッセイの免疫組織化学的な染色など、免疫組織化学的な方法によって測定されてもよい。免疫組織化学的な染色法により、細胞サンプルは典型的に脱水と固定によって調製され、その後、標識が通常、酵素の標識、蛍光の標識、発光標識などのように、視覚的に検知可能な場合、結合される遺伝子産物に特異的な標識抗体を伴う反応が生じる。

10

【0287】

サンプル流体の免疫組織化学的な染色及び／又はアッセイに役立つ抗体は、モノクローナル又はポリクローナルであってもよく、任意の哺乳動物で調製されてもよい。多くが市販で入手可能である。

【0288】

本明細書で請求される補足物も、形質移入中に形質移入の有効性及び細胞の生存率を増加させるために使用することができる。リポフェクタミンなどの、様々な形質移入技術において使用される条件と試薬は、細胞に対し比較的毒性である一方で、エレクトロポレーションは細胞を激しく強調する（stress）ことができる。より高い濃度の形質移入試薬の使用、及びより広範囲なエレクトロポレーション条件は、より高い形質移入の有効性を達成するのが好ましい。したがって、形質移入の前、それと一緒に、及びその後の本発明の補足物の追加は、より高い形質移入の有効性、及びより高い収量の組み換えタンパク質をもたらすことができる。

20

【0289】

本発明の補足物は、Apoptosisリガンド／TRAIL又はFasリガンドなどのアポトーシスを誘発する、対象のタンパク質を発現するために使用することができる。本発明の補足物の存在は、そのようなアポトーシスの活性を阻止し、対象のタンパク質の改善された発現を可能にしてもよい。

【0290】

加えて、方法は、冷凍／貯蔵／融解手順を受ける細胞の生存率を増加させるために使用することができる。これらの手順中、一般に、細胞は生存率を失う場合がある。細胞培地に加えられるアポトーシス阻害剤の存在は、細胞の生存率の増加を提供することができ、細胞のアリコート又はバイアルの間の細胞の生存率における変異性を減少させる又は除去するのに役立つ。

30

【0291】

〈X. キット〉

また、細胞の生存率を促進するためのキットが本発明によって包含される。1つの実施形態において、本発明によるキットは次のものを含む：（a）形質移入のための1つ以上の試薬又はデバイス、及び（b）本発明の補足物。幾つかの実施形態において、本明細書で特筆されるキットは、形質移入デバイス、形質移入薬剤及び補足物の使用に関する詳細を含む、指示書及び／又は宣伝材料を含む。

40

【0292】

別の実施形態において、本発明によるキットは次のものを含む：（a）細胞を凍結する又は融解するための1つ以上の試薬又はデバイス、及び（b）本発明の補足物。幾つかの実施形態において、本明細書で特筆されるキットは、細胞株を凍結する又は融解するためのプロトコル及び試薬の使用に関する詳細を含む、指示書及び／又は宣伝材料を含む。

【0293】

別の実施形態において、本発明によるキットは次のものを含む：（a）細胞を培養するための1つ以上の組織培養生成物及び（b）本発明の補足物。幾つかの実施形態において

50

、本明細書で特筆されるキットは、希釈クローニング技術に関するプロトコル及びそのような手法における試薬の使用に関する詳細を含む、指示書及び／又は宣伝材料を含む。

【0294】

〈実施例〉

〈実施例1：組み換え型のイネ粉の生成〉

方法：様々なデータ基礎からヒト血清アルブミンのタンパク質配列を比較した。受入番号P02768によって表わされる共通配列を、WO2007/002762において以前に記載されているような、イネ粒におけるヒト血清アルブミンの適切な発現に関する遺伝子コドン最適化のためのベースとして使用した。遺伝子合成を、Blue Heron（ワシントン州シアトル）によって実行し、合成フラグメントを、pUC-HSAを作るためにpUCベースのベクトル（pUC based vector）に挿入した。正確なDNA配列の確認後、ベクトルをMlyIとXhoIにより消化した。コドンにより最適化されたHSA遺伝子を含むフラグメントを、pAP1405に挿入し、それはNaeIとXhoIによりプリカットされた（precut）。プラスミドAP1405は、Gt1プロモーター、Gt1シグナル配列及びnosターミネーターを含む、ベクトルpAP1441（WO2007/002762）の誘導体であった。pAP1405へのMlyI/XhoIフラグメントの挿入は、下記に述べられるような照射による形質移入に使用された、ベクトルpAP1504をもたらした。

【0295】

粒子の照射を媒介としたイネの形質転換及び植物再生の基本的な手順を、以前に記載されたように行なった（Yi Chuan Xue Bao, 2001; 28(11):1012-8. Chinese and Biotechnol Prog. 2001;17(1):126-33）。イネの品種TP309種子の殻を取り（dehusked）、25分間50%（v/v）の市販用漂白液で殺菌し、滅菌水で洗浄した。殺菌された種子を、[N6塩（Sigma）、B5ビタミン（Sigma）、2mg/lの2, 4-D及び3%のスクロース]を含むイネのカルス誘導培地（RCI）プレートに置いた。イネ種子を10日間インキュベートし、カルス形成を誘発した。主要なカルスを種子から切開し、3週間RCIに置いた。照射及び継続的な継代培養に使用された、第2及び第3のカルスを生成するために、これを2回以上行った。1-4mmの直径のカルスを、照射前に5-24時間、0.3Mのマニトールと0.3Mのソルビトールを有するRCI上の4cmの環（circle）に置いた。微粒子銃による照射（Microparticle bombardment）を、微粒子銃の（Biolist）PDC-1000/Heシステム（Bio-rad）を使用して行なった。その手順は、2.5µgのDNAでコーティングされる1.5mgの金の粒子状物質（60µg/ml）を必要とする。DNAでコーティングされた金の粒子状物質を、1100psiのHe圧力（He pressure）でイネのカルス（rice calli）に照射した。

【0296】

照射の後、48時間でカルスを回復させ、次に選択用の30mg/lのヒグロマイシンBを有するRCIに移動させ、26℃で45日間暗やみの中でインキュベートした。形質転換されたカルスを選択し、9-12日間、5mg/lのABA、2mg/lのBAP、1mg/lのNAA及び30mg/lのヒグロマイシンBを含むRCI（マイナス2, 4-D）に移動した。形質転換されたカルスを、RCI（マイナス2, 4-D）、3mg/lのBAP、及びヒグロマイシンBが無い0.5mg/lのNAAから成る再生培地に移動し、2-4週間、連続的な照明条件下で培養した。再生成された小植物（高さ1-3cm）を、濃度が、1%のスクロース及び0.05mg/lのNMを加えたMS培地（Sigma）の半分であった発根培地（rooting medium）に移動した。2週後、発根培地上で、小植物は根を発育させ、芽は約10cmまで成長した。植物を、50%の商用土（Sunshine #1）と50%の水田からの土の混合物を含む、6.5×6.5cmのポットに移動した。植物を、100%近くの湿度を維持するためにプラスチック容器でカバーし、1週間連続的に光を当てて成長させた。透明プラスチックカバーを

1日の期間にわたってゆっくりと移し、徐々に湿気を減少させて、必要なときに水と肥料を加えた。遺伝子組み換えのR0植物がおよそ20cmの高さであった時、それらを成熟に成長する温室へ移した。

【0297】

個々のR0再生成植物からの個々のR1種子穀粒を、胚と胚乳に解体した。分離されたイネの胚乳中の組み換え型アルブミン発現レベルを測定した。高い組み換えタンパク質発現を有する個々のR1粒からの胚を、25分間50%の漂白剤で殺菌し、滅菌蒸留水により洗浄した。殺菌された胚を、1%のスクロース及び0.05mg/lのNAAを追加した1/2のMSの基礎の塩(1/2 MS basal salt)を含む組織培養管に入れた。胚は発芽し、約7cmの芽と健康な根系を有する小植物を約2週間で得た。成熟したR1植物を再生体として得た。

10

【0298】

異種のポリペプチドを含む遺伝子組み換えのイネは、乾式製粉又は湿式粉碎プロセスによってイネ抽出物に転換することができる。乾式製粉プロセスにおいて、異種のポリペプチドを含む遺伝子組み換えの種もみを、dehuskerによりその殻を取る。その後、例えば、1つの実験において、K-TECからのモデル91キッチン製粉機(model 91 Kitchen Mill)の速度3での乾式製粉プロセスにより、殻を取ったイネを挽いて細かい粉にした。

【0299】

〈実施例2：組み換え型のアルブミン(B0000C)の精製〉

20

方法：Ventricia grown riceに関して、イネをコンバイン又は手で収穫した。このプロセス中に、成熟種子をコンバインセパレーター又は手作業によって発達植物(vegetative plant matter)から分離した。採取されたイネを、鳥、齧歯類、トカゲ、昆虫及び他の害虫から穀物を保護する、清潔な穀物ビン、貯蔵トート、スーパーサック(supersack)、又は他の容器への貯蔵に適している点でおよそ12%の湿度にまで乾燥した。イネ粒が粉に必要とされるとき、先ず殻を取る又は皮を取る(dehulled)。このプロセスを真空下で行い、その結果、種子の碎片及び外側部分を胚乳及び胚又は糠層から払しょくする。殻を取った穀物をその後、洗浄して乾燥し、又は洗浄して湿式均質化(wet homogenization)などで直接加工し、或いは乾燥して殻を取った状態に更に加工する。乾燥して殻を取った材料を、白イネの生成者に共通の精イネ又は糠取り(debranning)用の機械によって糠をとってもよい(debranned)。

30

【0300】

糠を取り、殻を取ったイネを、この時点で洗浄して湿気ミルにかけるか、又は乾式製粉のために乾燥するか、又は挽いて粉にすることにより直接加工してもよい。最小量のせん断機と熱による製粉は、ローラーミル又はピンミルなどによるものが好ましい。ハンマーミルも適切である。激しい攪拌により、タンパク質を水において5分未満で90%まで抽出することができるように、粉を挽くべきである。通常、それは、400µm又は4mm未満である大きさの粒子を必要とする。しかしながら、より長い時間が与えられれば、より大きな粒子状物質を抽出することができる。あるいは、抽出可能な90%のタンパク質が可溶性になるように、穀物を洗浄し、セットアップされた液体のホモジナイザーにより湿式ミルにかける(wet milled)ことができる。

40

【0301】

粉スラリーを、少なくとも3部分の水対1部分の粉の比率、及び20部分までの水対1部分の粉の比率で典型的に混合する。水は、pHがおよそpH7に維持される、典型的にはトリス/HCl、シトラート、ホスファート、HEPESなどの適切な緩衝液、及び100mMのNaClなど少量の塩を含んでいる。スラリーを湿式粉碎の場合に均質化し、又は乾燥粉のために徹底的に混合した後、大量の固形物を固液分離によりスラリーから取り除く。これをデカント、遠心分離、又は濾過により実行する；例えば、パッドを有するプレート及びフレーム、加圧フィルター、ベルトフィルター、真空フラスコ、ハイドロク

50

ロン (hydroclone) 又は真空ベルトフィルター。濾過の後、圧縮したケーキを、ケーキからタンパク質を取り出すために抽出緩衝液により洗浄するべきである。珪藻土 (diatomaceous earth) 又は他の濾過材の追加は、濾液の透明度を促進するのに役立つが、正確な装置を考慮すると、必要ではない。あるいは、凝集剤を、浄化を支援するために使用してもよい。浄化された濾液を、そのアルブミン含有量に関して検査するべきであり、回収率が種もみ内で測定された発現レベルと一致していることを確認した。

【0302】

デンプン、沈澱可能なタンパク質、ウイルス、及び他の汚染物質を取り除くために、5 Mの酢酸を、pHが5.0に達し、溶液が白くなるまで、浄化された濾液に加える。白色の溶液を、不溶性の物質の沈殿を促進するために少なくとも20分間攪拌する。その後、沈殿された溶液を、キャニスターフィルター、カートリッジフィルター、又は限外濾過 (ultrafiltration) に適し、又は10NTU未満 (ネフェロメ濁度単位) である透明度に達する他の濾過装置などのデプスフィルターを通して濾過する。またそれは、フィルタプレス、加圧フィルターにより、又は代わりにクロスフローを利用するセラミックフィルター又は他の材料の使用により浄化することができる。加えて、この物質は拡張した床クロマトグラフィーカラム (bed chromatography column) への直接の適用に適している。

【0303】

好ましい方法において、浄化された濾液を、0.2ミクロンのフィルターを通す濾過によって浄化し、1MのNaOHによりpH7.0まで中和した。この物質はその後、中空繊維、フラットシート又は螺旋創傷クロスフロー濾過による限外濾過に適している。材料を、ウイルス、不要なより大きな汚染物質、及び凝集物を取り除くため、100キロダルトン (kDa) 以上の大きさの膜に通すことができる。膜を通る材料は、10又は30kDaのクロスフロー膜によって濃縮することができ、その後同じ膜はクロマトグラフィーのための溶液を調製するために使用することができる。濃縮した材料をその後、伝導率とpHが等しくなるまで、カラム平衡緩衝液により限外濾過する (diafiltered) ことができる。

【0304】

GE DEAEセファロース又はGE Qセファロース上での陰イオン交換クロマトグラフィーのための好ましい緩衝液は、pH8.0まで均衡のとれた10又は20mMのトリス/HCl緩衝液である。対照的に、例えば陰電荷を有するレジン又は疎水性のリンカーと混合した陰電荷を有するレジン (混合モードのアブソルバン)、又は代わりにブルーセファロース (GE) のようなブルーシビクロン (blue Cibicron) の使用を介する、陽イオン交換のための好ましい緩衝液は、pH4.8~5.0まで均衡のとれたアセテート又はシトラート緩衝液である。

【0305】

いずれかのシステムに関して、アルブミン及び他の同様に電荷を有するタンパク質を、マトリックスによって保持し、洗浄を、少なくとも5つのカラム体積の添加液によって緩く結合された材料を取り除くために行い、それはまた、疎水性の不純物を取り除くのに役立つことが必要であると見なされるような洗浄薬を含んでもよい。材料を、陽イオン交換のために2-4単位増加されたpH、又は陰イオン交換のために2-4単位減少したpHを有する同じ又は修正された緩衝液でカラムを帯電させることにより溶出することができる。結果として生じるpHにおける変化は、イオンの交換を可能にし、タンパク質は鋭い帯 (sharp band) で溶出されるであろう。溶出分画の純度を増加させるために、溶出ピークを精査することができ、その結果、第1部分 (10%) 又は最後の部分 (10%)、あるいはその両方の部分を主な溶出ピークから排除することができる。好ましい方法において、10mMのNaClを含む、100mM及びpH4.0に調節されたpHでのホスファートを含む溶液を、GE Qセファロース (速い流量) からタンパク質を溶出するために使用する。この場合において、pHと伝導率を、拘束力がない汚染物質 (フ

10

20

30

40

50

ロースルー及び洗浄)と、より強く結合する汚染物質(100mMのホスファート、10mMのNaCl、及び4.0に調節されたpHにおけるカラム上で保持されるもの)の間の区別を可能にする材料を溶出するために使用する。

【0306】

溶出後、溶出された材料のpHに6.0未満のpHがあると、それはその後1MのNaOHにより中和される。その後、結果として生じる溶液を、次のクロマトグラフィー工程のため同じ緩衝液に対して限外濾過し、それは好ましい方法において、100mMのホスファート、10mMのNaCl及びpH7.0を有する結合されていない様式以外においては、同じマトリックス(即ち、Qセファロース)のカラムを通して溶出剤(eluent)を流すことを含む。

10

【0307】

結合カラム上で共同溶出された汚染物質が、中性のpHでマトリックス上で保持される機会を有するように、第2のカラム工程は、最初ではあるが逆の様式で同じ原則を使用する。第1補足カラム(first capture column)からのフロースルー材料も、様々な代替型のクロマトグラフィー手法、例えば陽イオン交換、疎水性の混合された様式、ゲル濾過クロマトグラフィーにより処理することができる。

【0308】

好ましい方法において、Qセファロースの結合されていないカラムからのフロースルー材料を、濃度が15及び25%の間のアルブミンとなるまで、10kDa又は30kDaのクロスフロー上で濃縮する。その後、緩衝液を、ダルベッコPBS又は代わりに20mMのホスファート、50mMのNaCl、及びpH7.0などの細胞培養のための適切な緩衝液へのダイアフィルトレーションによって変える。材料をその後、無菌の段階で滅菌容器へ濾過する。無菌濾過された材料を、外膜ウイルスを破壊し、かつ疎水性の毒素及び汚染物質の除去を支援するための洗浄薬で処理してもよい。好ましい方法において、0.5%のv/vトリトンX-114又はX-100を、室温(23℃未満及び18℃以上)で15から25%のアルブミン溶液に加え、溶液を最も少ない時間で攪拌するか、かき混ぜる。その後、材料を、アルブミンの分子量よりはるかに少ない分子量排除限界を伴う、疎水性のレジン上に通す。多くの市販のレジンは、Biorad and Pall Corporationからものを含めて、利用可能である。

20

【0309】

その後、カラムを通過する材料を、生物活性を確認するため洗浄薬に敏感な細胞において試験してもよい。残存する残余の洗浄薬は、アルブミン溶液に関して典型的に0.005%未満であるべきである。洗浄性の遊離フロースルーをその後、直接の出荷用の容器へ無菌濾過することができ、又は追加された安定剤を有することができ、又は安定剤で低温殺菌にさらすことができ、又は乾燥の前に加えられる或いは直接乾燥される安定剤を有することができる。材料を凍結乾燥又は噴霧乾燥によって乾燥してもよい。乾燥前に、いくつかの例において、それは、GE、Pall及びMilliporeから利用可能なものなどの、使い捨てであり有効なウイルス除去カプセルを使用して、材料をウイルスの濾過工程にさらすことに役立つかもしれない。前濾過工程が効果的に及び経済的に20nmのフィルターを介して濃縮した材料を通すために必要であると理解することは、当該技術分野において一般的である。

30

40

【0310】

結果：イネ粉をリン酸緩衝食塩水において1:5の比率で抽出し、20分間混合した。液体をNalgeneの濾過フラスコを使用して浄化した。その後の浄化した抽出物を、方法に記載されているように酸沈殿にさらした。その後、溶液を濾過し、中和して、浄化された濾液を得た。材料と緩衝液が平衡に保たれるまで、この物質を50mMのトリス/Cl、pH8.0に対して限外濾過した。その後、材料を、50g/lの結合能力を許容するため、あらかじめ平衡に保たれたGE Qセファロースカラムに充填した(300-600cmh)。充填された物質を同じ緩衝液で洗浄し、該物質をその後、上述のような100mMのホスファート、10mMのNaCl、及びpH4.0で溶出した。材料を

50

急なピークで溶出し、収集された溶出液は約 5.8 の安定した pH を有した。この方法を使用して生成されたアルブミンを、以下でより十分に開示されるようなアルブミンの他の源と比較した：溶出液をプールに集め、pH が 6.0 以上となるまで、1 M の NaOH を加えた。その後、材料を 10 kDa の再生セルロース膜上でおよそ 5 倍に濃縮し、およそ 5 等量のダイアフィルトレーションを、100 mM のホスファート、10 mM の NaCl、pH 7.0 で実行した。最終の限外濾過を行った材料を、アルブミンタンパク含有量（出発物質中の発現レベルに関連して、80% 以上であるべきである）及びエンドトキシンレベル（供給材料に依存して 100 EU/mg 未満であるべきである）について確認する。この物質を、Qセファロースカラム上に通し（60–160 cmh）、およそ 2–3 倍の充填量を許容するのに十分な大きさの 100 mM のホスファート、10 mM の NaCl、pH 7.0）により平衡に保った。物質を同じ緩衝液でレジンにより洗浄し、収集した。収集された材料を、10 kDa の再生セルロース膜の上で限外濾過し、およそ 10 倍に、又はアルブミン濃度が少なくとも 10% 又は多くとも 20% に達するまで濃縮し、5 等量のダイアフィルトレーションを 20 mM のホスファート、50 mM の NaCl、pH 7.0 により行なった。無菌の等級濾過（sterile grade filtration）（0.2 μm）の後、溶液を 20 ± 2 °C で、0.5%（v/v）のトリトン X-100 により 1 時間攪拌した。インキュベーション後、材料を製造業者の指示に従って Pall SDR レジンを介して通した。フロースルー材料を滅菌容器へと無菌等級で濾過を行い、タンパク質と食塩水（salt solutions）に共通するように、冷却又は凍結乾燥した。

【0311】

〈実施例 3：アルブミンの他の源と比較される B0000C プロセスを使用してイネから生成される組み換え型アルブミンと、アルブミンの生成のための以前の方法の比較〉

方法：実施例 2 に記載される方法を使用して調製されるアルブミンを、Cellastim（バッチ B202 から B217）を調製するために以前に使用された代替のプロセス（B000）を使用して調製されたアルブミンと比較した。

【0312】

〈アルブミン生成（古いプロセス、B000）〉

イネ粉及び 25 mM のリン酸ナトリウム、50 mM の塩化ナトリウムを、NaOH により pH 6.5 になるまで均衡をとり、およそ 1:10 の S/L 比率により、室温で 20 分間混合した。濾過促進剤（Cellpure 300）を 10 g/L で加え、スラリーをフィルタプレス、吸引濾過、又は遠心分離によって濾過した。浄化された濾液を、1 M の酢酸で pH 5.0 まで酸沈降した（acid precipitated）。結果として生じる溶液を、5 g/L の濾過促進剤（Cellpure 300）の追加と共に、上述されるように濾過した。材料を、1 M の NaOH により pH 6.5~7.0 まですぐに中和した。材料を、抽出に使用される同じ緩衝液の 5 等量（equal diavolume）により限外濾過した（すべての UFDF 工程のための 10 kDa の再生セルロース）。60 cmh で、レジン 1 リットル当たり結合する 8 g のアルブミンを許容するために、材料をあらかじめ平衡に保たれた Qセファロースカラム（GE Healthcare）に充填した。

【0313】

5 つのカラム体積の同じ緩衝液によりカラムを洗浄した後、アルブミンを、1 工程において塩の濃度を 250 mM の NaCl にまで増加することにより溶出した。結果として生じる材料を、5–7 等量で 100 mM のリン酸ナトリウム、10 mM の NaCl、pH 7.0 に対して限外濾過した。結果として生じる材料を、100 mM のリン酸ナトリウム、10 mM の NaCl、pH 7.0 により平衡に保たれた Qセファロースカラム上に通し、フロースルーとして収集した。フロースルー材料をその後濃縮し、5 容量で 20 mM のリン酸ナトリウム、10 mM の NaCl、pH 7.0 に対して限外濾過した。最終濃縮された材料を無菌濾過し、10 g/L の洗浄性の CHAPS（（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ）-1-プロパンスルホン酸）でインキュベートし、室温で 1 時間混合し

た。1時間のインキュベーションの後、材料をBiorad SM-2カラム上に通した。材料を無菌濾過し、凍結乾燥した。

【0314】

〈サイズ排除クロマトグラフィー分析〉

HPLCによる純度分析を、214及び280nmに設定された検出器を用いて、1ml/minの流量で、GF-250カラム(Agilent Technologies)上で100mMのリン酸塩、pH7.0において行なった。標準曲線は、塩と水分に関して0.92の補正因子を有する乾燥粉によって作られた5つの異なる希釈液の注入により進行した。214nmからの主なピークを、持続時間又は代わりに基線のいずれかによって統合した。未知のサンプルを、標準の注射の範囲内にある濃度で注入した。乾燥粉重量(純度)につきアルブミンの未知の濃度を標準曲線から計算した。典型的な実験において、標準の0、5、8、10、15及び20µgを注入し、その後およそ50µLの注入量における道のサンプルのおよそ10µgを注入した。ピークを統合した後の標準曲線に関する相関係数は、典型的には0.98以上だった。

【0315】

〈SDS PAGE及び密度計測：(硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法)〉

サンプルを、各々のタンパク質の定義された量を各々の容器に充填できるようにするために、1-2mg/mlまでタンパク質溶液を希釈することにより調製した。サンプルを、還元剤(Invitrogen NP0004)を含むトリス-グリシンSDSサンプル緩衝液(LC2673 Novex)と1:1で混合し、70℃で5分間加熱した。サンプルを、Novexの4-20%のプレキャストゲルに充填し(10、20、又は30µg)、標準のトリス-グリシン-SDSランニングバッファにおいて定電圧(130V)で分離した。追跡用色素がゲルの終わりに達した時、電気泳動が終了した。分子量マーカーは参照として最初のレーンに含まれた。

【0316】

ゲルをG Bioscience(786-35G)で染色し、水で脱染した。デジタル画像をヒューレットパッカードスキャナ(G4010)により得た。その後、画像ファイルをUN-SCAN-IT(Silk Scientific Corp.)で開いた。密度計測を、全ての可視帯が個々のセグメントとして含まれていた256のグレイスケールにおける陽画像分析により実行した。背景雑音を、各々のセグメントのためソフトウェアで明白にされるような4角の補間(four corner interpolation)によって修正した。その後、各々のセグメント又は帯に関するシグナルを、ピクセルの#及び平均ピクセル強度(0-255)の生成物から計算した。全レーンのシグナルの合計(すべての可視のセグメント又は帯)を100%として得て、不純物帯を、アルブミン純度を計算するために控除した。各々の帯における各々の混在タンパク質の割合を、特定の帯において同定されるすべてのペプチドの総数で分割されるペプチドマッピングによって測定されるようなその汚染物質タンパク質のために同定される、ペプチドの数として計算した。標準偏差が100%のうち0.5%未満となるように、画像分析を3回繰り返した。

【0317】

〈パイロジェン rFC方法によるエンドトキシンの測定〉

エンドトキシン含有量をパイロジェン rFC方法によって測定した。凍結乾燥されたエンドトキシン標準を、標準曲線を進行させるために製造業者(Lonza)によって明白にされるようなエンドトキシン遊離水と混合した。タンパク質サンプルを、液体の場合は希釈し、又は代わりに、粉末の場合はエンドトキシン遊離水で再構成した。数値が標準曲線の範囲内に現われるように、異なる希釈液を調製した。サンプルを、不要な分子の相互作用を分離するため、100℃で10分間加熱した。典型的な実験において、サンプルと標準を、容器につき0、0.001、0.005、0.01、0.05及び0.1のエンドトキシン単位で、容器につき100µlで加えた。サンプルも100µlで加え、余

剰のサンプルを含み、その結果、容器につき0.001-0.01のエンドトキシン単位を有するスパイク (spiking) を、アッセイ阻害又は干渉に関して試験するために加えた。作用する試薬を、それぞれ1:4:5の比率で、rFC酵素、アッセイ緩衝液、及び基質を混合することにより製造業者 (Lonza) に従って調製する。作用する試薬を、サンプル又は基質と等量で容器に加えた。蛍光プレートリーダー (Biotek FLX 800T) を380nm (帯域幅=20nm) での励起のために設定し、放射波長を440nm (帯域幅=30nm) に設定した。0時間で得られる数値 (reading) を、37℃で1時間後に得られる数値から控除する。標準に関する相関係数、勾配、及びY切片が一式の制限内にある場合、数値を有効であると考え、スパイク実験は、スパイクがされたエンドトキシンが一式の制限内で測定可能及び復元可能であったことを示す。加えて、標準偏差が、明白にされ、恣意的に選択された制限内にあったように、二重のサンプルに関する標準偏差は合理的な合意にあるべきである。サンプルをすべて無菌的に収集し、試験に使用された管/バイアル/容器を、それらが正確で精密なエンドトキシン試験に関するような優良実験室規範に従う、極端に低いエンドトキシンであると確認した。

10

【0318】

〈細胞の生存率の測定〉

ハイブリドーマ細胞株AE1 (ATCC) を、5%のウシ胎児血清 (FBS) を含むDMEMの塩基性の媒体 (basic media) において維持した。アルブミンを、ウシ胎児血清を補足することなく、血清遊離の条件 (AFM6, KC Bio, Kansas) 下で試験した。細胞を、複数の継代にわたって5%のFBSから血清遊離媒体まで継代培養した。各々の継代培養では、細胞をアルブミンの示された濃度が存在する状態での全細胞数と生存率に関して分析した (トリプシン処理、及びNeubauer haemocytometerを使用して直接数えることによって評価されるように)。細胞は、培養に関する生存率が測定された後およそ70時間、標準培養条件 (5%のCO₂ 及び37℃) 下で成長した。実験を全く同じように行なった。データは、10⁵に分けられた生細胞/mlの数を示す。

20

【0319】

〈洗浄薬の測定〉

アルブミンに関する洗浄性の濃度を洗浄薬 (細胞ベース) アッセイによって測定する。簡潔に、洗浄薬感受性細胞を異なる量の洗浄薬でスパイクし (spiked)、結果として生じる細胞生存率の細胞測定を、16の独立したデータポイントから成る標準曲線を生成するために使用した。洗浄薬の濃度の変化に対する生存率の変化をプロットし、対数関数と一致させた。その後、この方程式を、同じ細胞ベースのアッセイで試験されるサンプルにおける未知の洗浄薬濃度を計算するために使用した。与えられるデータに関する標準曲線のための相関係数は、0.9816であった。典型的には、Cellastimの乾重量当たり約10ppm以上の洗浄薬の濃度は、顕著な毒性の活性をもたらす。10%のアルブミン溶液における比較により、洗浄薬の濃度が約100ppmから200ppm以上又は0.01%から0.02% (v/v) であるとき、洗浄薬の毒作用が明らかになる。

30

【0320】

〈結果及び考察〉

〈I. 血漿由来の血清 (Sigma Albumin)、及び実施例2のプロセス (Cellastim P0171) 及び古いプロセス (Cellastim P0107) を使用して生成される組み換え型のHSA (Cellastim) のサイズ排除クロマトグラフィーによる分析〉

3つのタイプのアルブミンに関するHPLCサイズ排除特性 (図1A、C、及びD) は、全体的な純度に関し、異なるアルブミン製剤が一般に類似することを示す。具体的には、およそ4.5kDa及び240kDaのピークは内部制御である一方で、全ての3つの生成物は、約10-12kDaでごく少量のオフメインピークシグナル (off main peak signal) を含む。

40

50

【0321】

ヒト血清由来のアルブミン (Sigma Albumin) (図1A) は約17kDaで汚染物質を含む一方で、新しいプロセス (Cellastim P0171) (図1C) を使用する組み換え型イネ由来のアルブミンは、古いプロセス (Cellastim P0107) (図1B) を使用するときよりも著しく高いレベルで、新しいプロセスで作られるCellastimにおいて生じる、およそ44kDa及び55kDaの2つのタンパク質汚染物質を含む。これらのピークは、HPLC分離で完全には分解しないが、Cellastim P0171及びシグマアルブミン (図1D)、及び図1Eで示される古く新しいプロセスを使用して作られたCellastimの、覆われた特性 (overlaid profiles) においてよりはっきりと見ることができる。

10

【0322】

これらのピークに相当するタンパク質は、更に以下に考察されるように、実施例2に記載のプロセスを使用して生成されたCellastimにおける主なアルブミンピークのペプチドマスフィンガープリンティング分析によって確認された汚染物質タンパク質のすべての約5%を表わす。

【0323】

試験されるすべてのアルブミン生成物も、おそらくアルブミン二量体を表わす約130kDaでのピークを含み、Cellastim二量体ピークが血漿由来のアルブミンよりかなり小さいことは顕著である。凝集アルブミンの創造は、業界全体における安定性 (stability industry wide) の分解又は損失のため1つのマーカーとして使用されるタンパク質分解の指標である。Hsp70及び他のHspタンパク質の一般に知られている機能であるため、おそらく、Hspsはアルブミンの脱凝集を促進するCellastimの中に存在し、それ故、二量体の数を減らす。

20

【0324】

〈I I. Millipore/Novozymes (Cat No. 9301-01) により生成されるアルブミンと比較される、CellastimバッチP0171 (新しいプロセス) のSDS PAGEによる分析〉

結果: SDS-PAGE分析 (図2A及びB) は、全体的な純度に関し、生成物が一般に類似することを示す。図2Aは、Cellastim P0171及びCellprimeアルブミン (Millipore/Novozymes) の比較を示す。レーン1は分子量マーカーである。レーン4はCellastimアルブミン (10µg) であり、レーン7はCellprimeアルブミン (10µg) である。図2Bは、以前のプロセス (B000) (レーン2、3及び4)、及び新しいCellastimプロセス (B0000C) (レーン6、7及び8) からの3つのCellastimロットのSDS PAGE分析による比較を示す。6つのサンプルをレーン当たり20µgで充填する。

30

【0325】

ゲルの目視検査は、より正確な仕様書を満たす新しいプロセスが、試験される3つのロットにおいてより一貫していることを示す (図2B、レーン2、3、4対レーン6、7、8)。横縞模様は、新しいプロセスと比較して、以前のプロセスからの3つのサンプルの中で著しく異なる。重要なことに、新しいプロセスサンプルは、古いプロセスサンプルが有するよりも著しく少ない約250kDaでの凝集体を有する。(古いプロセスに関しては平均2%以上、新しいプロセスに関しては平均1%未満)。新しいプロセスを使用して生成されるCellastimで濃縮される (enriched) タンパク質汚染物質の同一性を、更に以下で考察する。

40

【0326】

〈I I I. エンドトキシン、洗浄薬、及びCellastimの古く新しいバッチの能力を促進する成長の分析〉

アルブミン (表E1及びE2) のいくつかの異なるロットを調製するための、2つの異なるプロセスの実行の比較は、古いプロセスが、実施例2に記載される新しいプロセスと比較して、著しく多くのエンドトキシン及び洗浄薬を含んでいた組み換え型アルブミンを

50

生成し、細胞の生存率を著しく高めた生成物をもたらしたことを実証する。

【 0 3 2 7 】

【 表 9 - 1 】

表E1								
Cellastim - 古いプロセス B000								
生成日	バッチの 番号	生成物の グラム (Grams product)	EU/mg 乾燥材料	洗浄薬 (ppm)	生存率 (生細胞数 / ml / 10 ⁵)			
					1mg/ ml	2 mg/ ml	5 mg / ml	10 /mg ml
2/27/08	B202	70.6	25.3	3313	15	7.9	4.1	0.9
2/27/08	B203	58.8	23.1	946	15.8	12.4	6.5	4.1
2/28/08	B204	59.9	29.2	1371	16.3	11.1	5.2	2.9
2/28/08	B205	63	64.3	1250	14	11.6	6.9	3.8
3/3/08	B206	41.1	35.1	11602	14.9	2.3	0.0	0.0
3/3/08	B207	94.2	28.7	750	16.5	12.7	7.6	4
3/4/08	B208	24.5	>80	1250	15.3	11.4	7.1	2.7

【 0 3 2 8 】

【表 9 - 2】

3/4/08	B209	66.1	91.8	595	16.7	15.2	6.9	4.1
3/4/08	B210	87.3	67.8	77	17.5	19.1	15.4	8.5
3/11/08	B217	62.09	4.4	430.5	16.7	18.7	13.2	6.6
平均			44.97	2158.5	15.8 7	12.2 4	7.29	3.76

表E2

Cellastim - 新しいプロセス B0000C

生成日	バッチの 番号	生成物の グラム (Grams product)	EU/mg 乾燥材料	洗浄薬 (ppm)	生存率 (生細胞数 / ml / 10 ⁵)			
					0.5mg /ml	2 mg/m l	5 mg / ml	10 /mg ml
2/2/2009	B0032C	209.4	0.35	170	13.1	15.7	13.4	11.2
2/2/2009	B0033C	271.4	0.26	検出されず (not det.)	18.4	17.4	15.1	14.3
2/10/200 9	B0041C	247.1	0.18	93	15.4	17.2	14.1	12.1
4/27/200 9	B0118C	617.4	0.11	検出されず	15.7	15.4	19.2	16.8
5/14/200 9	B0138C	610.6	0.48	102	12.5	15.8	15.1	14.6
6/9/2009	B0158C	598.0	0.13	141	13.7	17.1	13.2	11

【 0 3 2 9 】

【表 9 - 3】

6/15/200					15.5	17.5	17.2	14.7
9	B0162C	618.6	0.20	検出されず				
7/28/200					17.4	17.3	18.8	14.8
9	B0196C	507.0	0.36	検出されず				
8/26/200					17.9	16.3	16.6	13.7
9	B0219C	851.4	0.86	検出されず				
8/31/200				77	13.5	16	15.5	15.1
9	B0220C	897.8	0.93					
9/9/2009	B0227C	929.9	0.13	270	11.1	14.4	12.5	11.4
平均			0.36	142.2	14.92	16.37	15.52	13.6

【0330】

考察：実施例 2 に記載の新しいプロセスを作り出すために古いプロセスを再度計画実行することにより、さらに十分に以下に記載されるように、全体的な生成物の純度及び実行の両方において有意な変化をもたらした。

【0331】

この変化は、洗浄薬においてさらに低く、エンドトキシンにおいてさらに低く、及び純度を増加した生成物を作ることができることに可能にした。具体的に、新しいプロセスは、約 95% 以上の全体的な純度を有する組み換え型のアルブミンを定期的に生成した。比較して、古い方法は、約 90% の最大の純度を有するアルブミンを定期的に生成した。驚くことに、生成物純度の増加にもかかわらず、プロセスにおけるこれらの変化はまた、組み換え型アルブミンで、熱ショックタンパク質の高められた同時精製をもたらした（以下を参照）。任意の特定の動作理論と組み合わせることなく、高いアルブミン純度、エンドトキシン及び／又は洗浄薬の相対的な欠如、及び熱ショックタンパク質の同時精製の組み合わせは、アルブミンを調製するため以前の方法を有意に行なう生成物をもたらすと信じられている。

【0332】

具体的に、表 E 1 及び E 2 は、Cellastim を生成する新しいプロセスが、例えば 5 mg/ml で、細胞の生存率（5 mg/ml で）における平均のバッチ間で 100 パーセントの改善をもたらす生成物をもたらす、また、古いプロセスより平均 100 倍少ないエンドトキシン、及び 100 倍少ない洗浄薬を有する生成物をもたらすことを実証する。

【0333】

＜実施例 4：細胞増殖と生存率に対する効果の分析＞

本発明の補足物の能力を促進する細胞増殖を促進する能力を、他の市販のアルブミン生成物と比較するために、アルブミンの異なる源を、細胞増殖と生存率アッセイにおいて並行して比較した。試験される 3 つの生成物は、（Cellastim, Lot # P0153）Cellprime アルブミン（Millipore/Novozymes Cat No. # 9301-01）及び血漿由来のアルブミン（Seracare Cat No. # HS-400-60）であった。

【0334】

方法：特別に調整されたハイブリドーマ細胞 A E 1 を、残余の培地を取り除くために同じ培地で 2 度洗浄した後、培地 1 m l 当たりの 0.5×10^5 の細胞の密度で、D F 1 2 / I T S E において播種した。その後、培地と細胞を、未処理のままにし（陰性対照）、S e r a c a r e アルブミンで処理し、C e l l p r i m e アルブミンで処理し、及び図の説明文で示される濃度で C e l l a s t i m により処理した。細胞を、培養に関する生存率が測定された後およそ 70 時間、標準培養条件（5 % の $C O_2$ 及び 37 °C）下で成長させた。実験を複製して行なった。結果を図 3 に示す。

【0335】

結果：N o v a z y m e ' s C e l l p r i m e は、生存率（並行線模様の棒（c r o s s - h a t c h b a r））における損失を引き起こした。S e r a c a r e アルブミン（白い棒）は、生存率における測定可能な増加を引き起こしたが、イネの h s p s （黒い棒）を有する組み換え型アルブミンを含む本発明の補足物と共に見られるものの程、大きな増加ではない。これらの条件下で、C e l l a s t i m は、試験される任意の濃度で、他のアルブミン生成物のいずれかと比較される細胞の生存率を促進する際に、およそ 5 倍活性であった。陰性対照を、縞模様の棒に表わす。

10

【0336】

考察：他の市販のアルブミン生成物が、C e l l a s t i m に対する類似した全体的な純度、エンドトキシン、及び洗浄薬レベルを有する可能性を考慮すると、他の市販のアルブミンと比較される本発明の組み換え型アルブミンの劇的に優れたパフォーマンスは、血清由来のアルブミン（実施例 2）と比較される C e l l a s t i m で確認される、以前に確認されていないタンパク質汚染物質が、細胞の生存率に陽性の影響を及ぼすかもしれないことを示唆する。これらタンパク質の C e l l a s t i m の特性への影響を確認し、その後特徴づけるため、以下に記載のように、組み換え型アルブミンのサンプルをペプチドマスフィンガープリンティングにさらした。

20

【0337】

〈実施例 5：組み換え型ヒト血清アルブミンのペプチドマスフィンガープリンティング〉

方法：アルブミンのサンプルを、N a n o L C M S / M S ペプチド配列決定システム（P r o t T e c h, I n c. ）、及びペプチド断片の分子量に基づいてタンパク質を確認する専売のソフトウェアを使用して、著しいタンパク質汚染物質を測定するために分析した。要するに、アルブミンのサンプルを、S D S - P A G E によって分析し、主要なバンドゲルバンド（b a n d g e l b a n d）を脱染し、きれいにし、配列決定段階修正トリプシン（s e q u e n c i n g g r a d e m o d i f i e d t r y p s i n）で、ゲル内で消化した。結果として生じるペプチド混合物を、L C - M S / M S システムによって分析し、それにおいて、75 マイクロメートルの内径逆相 C 18 カラムでの高圧液体クロマトグラフィー（H P L C）は、イオントラップ質量分光計と組み合わせられてオンラインで使用された。獲得した質量分光計のデータを、P r o t T e c h の専売のソフトウェアスイートで最近の非重複のタンパク質データベースを調査するために使用した。データベース調査からの出力を、報告前に手動で検証した。

30

【0338】

結果：組み換え型アルブミンの 3 つの代表的なロットの試験に際して、3 つの H s p 70 タンパク質をペプチドマスフィンガープリンティングによって確認した（表 E 3）。3 つの特異的な配列を次のように確認した：A B F 9 5 2 6 7、A B A 9 7 2 1 1 及び B A D 0 7 9 3 8 を、非常に関連性のある相同タンパク質を確認するために非重複性のデータベースと比較した。これらの比較の各々からトップヒット（t o p h i t）の結果を、表 E 4、E 5 及び E 6 で示す。

40

【0339】

【表 10】

表E3 マスフィンガープリンティングによってCellastimから確認されるペプチド	
配列	ペプチド
ABF95267	ATAGDTHLGGEDFDNRVVPGPADKSPMIVVITYKGEEK NAVITVPAYFN DSQRIINEPTAAAIAYGLDKK (配列番号9)
AAB63469 BAD07938 BAD07713	NQAAVNPER NGHVEIANDQGNRIVNKDGKPYIQVK IINEPTAAAIAYGLDKK KLGTVIGIDLGTITYSCVGVYK VEIESLFDGTDSFSEPLTR (配列番号10)
ABA97211	NQADSVVYQTEKKQDITITGASTLPKDEVERDVVLLDVTPLSLGLET LGGVMTK (配列番号11)

10

【0340】

Genbank (登録商標) (Nucleic Acids Research, 2008 Jan; 36 (Database issue): D25-30) における、タンパク質配列の非重複性のデータベースにおける ABF95267 配列に対する配列比較の結果を、以下表 E 4 に示す。

20

【0341】

【表 1 1 - 1】

表 E4			
ABF95267を伴う著しい整列を生成する配列:			
遺伝子の参照番号	遺伝子の説明	(ビット)	値
reflNP_001140835.1	仮説のタンパク質 LOC100272911 [Zea ma...	79.7	8e-14
reflXP_002465468.1	仮説のタンパク質 SORBIDRAFT_01g039390...	79.7	9e-14
reflNP_001049719.1	Os03g0277300 [イネ (japonica cult...	79.7	9e-14
gb ACJ54890.1	熱ショックタンパク質 70 [ジャポニカ種のイネ ... (Oryza sativa Japonica G...)	79.7	9e-14
sp P09189.1	HSP7C_PETHY RecName: Full=熱ショック 同族 70 k...	77.0	5e-13
emb CAA31663.1	hsp70 (AA 6 - 651) [ペチュニア(Petunia x hybrida)]	77.0	5e-13
reflXP_002312089.1	予測されたタンパク質 [コットンウッド] >...	77.0	5e-13
sp P24629.1	HSP71_SOLLC RecName: Full=熱ショック 同族 70 k...	77.0	5e-13
gb AAB99745.1	HSP70 [コムギ]	76.6	6e-13
gb AAB42159.1	Hsc70 [トマト]	76.6	7e-13
gb ACD45076.1	熱ショックタンパク質 70 [オーチャードグラス]	76.3	8e-13
reflXP_002512741.1	熱ショックタンパク質、推定上の[トウゴマ ...	75.9	1e-12
reflXP_002512742.1	熱ショックタンパク質、推定上の[トウゴマ ...	75.9	1e-12
gb AAA82975.1	PsHSP71.2 >emb CAA67867.1 熱ショック タンパク質 ...	75.9	1e-12
gb AAS09825.1	熱ショック同族タンパク質 70 [塩性植物... (Thellungiella h...)	75.9	1e-12
emb CAA44820.1	熱ショックタンパク質 70 [タバコ]	75.5	2e-12
reflNP_001055754.1	Os05g0460000 [イネ (japonica cult...	75.5	2e-12

【 0 3 4 2】

【表 1 1 - 2】

ref NP_001051724.1 	Os03g0821100 [イネ (japonica cult...	75.1	2e-12
ref XP_002456611.1 	仮説のタンパク質 SORBIDRAFT_03g039360...	75.1	2e-12
ref NP_001044757.1 	Os01g0840100 [イネ (japonica cult...	75.1	2e-12
gb ACR35910.1 	不明の [トウモロコシ]	75.1	2e-12
ref XP_002284017.1 	PREDICTED: HSC70-1 (熱ショック... に類似	75.1	2e-12
ref XP_002532297.1 	熱ショックタンパク質、推定上の [トウゴマ ...	75.1	2e-12
ref XP_002284008.1 	PREDICTED: HSC70-1 (熱ショック... に類似	75.1	2e-12
ref XP_002283532.1 	PREDICTED: HSC70-1 (熱ショック... に類似	74.7	3e-12
ref XP_002332067.1 	予測されたタンパク質 [コットンウッド	74.7	3e-12
gb AAF34134.1 	高分子量の熱ショックタンパク質 [Malu...	74.7	3e-12
gb EEC76425.1 	仮説のタンパク質 OsI_14101 [イネ I...	74.7	3e-12
ref XP_002316294.1 	予測されたタンパク質 [コットンウッド]>...	74.7	3e-12
ref XP_002283516.1 	PREDICTED: HSC70-1 (熱ショック... に類似	74.3	3e-12
ref XP_002441219.1 	仮説のタンパク質 SORBIDRAFT_09g022580...	74.3	4e-12

【0343】

Genbank（登録商標）における、タンパク質配列の非重複性のデータベースにおける配列に対するABB63469の配列比較の結果を、以下表E5に示す。

【0344】

【表 1 2】

表 E5			
AAB63469を伴う著しい整列を生成する配列:			
遺伝子の参照番号	遺伝子の説明	(ビット)	値
emblCAP31983.1	C. briggsae CBR-HSP-4 タンパク質 [カエノルハブディティス属...	50.1	7e-05
dbj BAG60366.1	無名のタンパク質生成物 [ヒト]	49.7	8e-05
ref YP_002421952.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.7	9e-05
ref YP_001640420.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.7	9e-05
ref NP_001105893.1	結合タンパク質ホモログ1前駆体 [トウモロコシ ...	49.3	1e-04
gb AAA62325.1	HSP70	49.3	1e-04
ref YP_001756576.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.3	1e-04
gb AAB63469.1	胚乳内孔の結合タンパク質 [イネ]	49.3	1e-04
ref YP_001925829.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.3	1e-04
ref NP_001105894.1	結合タンパク質ホモログ2前駆体 [トウモロコシ ...	49.3	1e-04
gb ACF86491.1	不明の [トウモロコシ]	49.3	1e-04
ref NP_001045675.1	Os02g0115900 [イネ (japonica cult...	49.3	1e-04
ref ZP_02191025.1	分子シャペロン [α プロテオバクテリウム...	49.3	1e-04
ref XP_001701685.1	結合タンパク質 1 [コナミドリムシ...	48.5	2e-04
ref XP_001701884.1	結合タンパク質 2 [コナミドリムシ...	48.5	2e-04
emblCAC37635.1	内孔の結合タンパク質、BiP [Scherffelia dubia]	48.1	3e-04
gb AAM93256.1	熱ショックタンパク質 70-C [ダイズシスト線虫] ...	48.1	3e-04

【0 3 4 5】

Genbank (登録商標) における、タンパク質配列の非重複性のデータベースにおける配列に対する配列 A B A 9 7 2 1 1 に対する配列比較の結果を、以下表 E 6 に示す。

【0 3 4 6】

【表 1 3】

表 E6 ABA97211を伴う著しい整列を生成する配列：			
遺伝子の参照番号	遺伝子の説明	(ビット)	値
gbIAAK13022.1	熱ショックタンパク質 70 [フィプロバクター サクシノゲネス(succinogene)...	<u>44.3</u>	0.004
reflXP_002442079.1	仮説のタンパク質 SORBIDRAFT_08g009580...	<u>44.3</u>	0.004
gbIEEC69073.1	仮説のタンパク質 OsI_37938 [イネ I...	<u>44.3</u>	0.004
reflXP_001752769.1	予測されたタンパク質 [ニセツリガネゴケ...	<u>44.3</u>	0.004
reflNP_001066486.1	Os12g0244100 [イネ (japonica cult...	<u>44.3</u>	0.004
gbIACT65562.1	70 kDa 熱ショックタンパク質 [コムギ]	<u>43.9</u>	0.005
reflNP_001152528.1	間質性の 70 kDa 熱ショック関連タンパク質 ...	<u>43.9</u>	0.005
gbIACN31310.1	不明の [トウモロコシ]	<u>43.9</u>	0.005
reflXP_001772650.1	予測されたタンパク質 [ニセツリガネゴケ...	<u>43.9</u>	0.005
reflNP_001146752.1	仮説のタンパク質 LOC100280354 [トウモロコシ ...	<u>43.9</u>	0.005
gbIABP65327.1	クロロプラスト熱ショックタンパク質 70 [ペニセタム ...	<u>43.9</u>	0.005
gbIAAO72585.1	熱ショック関連タンパク質 [イネ (japo...	<u>43.5</u>	0.007
reflYP_001740846.1	シャペロンタンパク質 dnaK (熱ショックタンパク質	<u>43.5</u>	0.008
reflZP_03728467.1	シャペロンタンパク質 DnaK [Dethiobacter alkal...	<u>43.1</u>	0.009

【 0 3 4 7】

考察：ペプチドマスフィンガープリンティングは、アルブミンにより同時精製する 3 つのイネの熱ショックタンパク質のスーパーファミリーメンバー、2 つのイネの H S P 7 0 遺伝子、(g b | A C J 5 4 8 9 0 . 1 |)、E E C 6 9 0 7 3、及びイネの内乳組織 (内乳の管腔の結合タンパク質) からの A A B 6 3 4 6 9 - B i P 同族体を確認した。これら遺伝子によってコード化された完全なアミノ酸配列を、以下に記載する：

【 0 3 4 8】

遺伝子 g b | A C J 5 4 8 9 0 . 1 | 熱ショックタンパク質 7 0 [イネ (O r y z a s a t i v a J a p o n i c a G r o u p)] H S P 7 0 を、およそ 0 . 0 7 % の重量／重量で、C e l l a s t i m における組み換え型アルブミンで生じることを見出した。その完全なアミノ酸コード配列を以下のように提供する：

【 0 3 4 9】

【化2】

1 magnkgegpa igidlgttys cvgvwqhdrv eiiandqgnr ttpsyaftd terligdaak
 61 nqvamnptnt vfdakrligr rfsdpsvqad mkmwpfkvvv gpadkpmivv tykgeekfks
 121 aeeissmvlv kmkeiaeafl sttiknavit vpayfndsqr qatkdagvis glnmvriine
 181 ptaaaiaaygl dkkaastgek nvlifdlggg tfdvsiltie egifevkata gdthlggedf
 241 dnrnmvnhfvq efkrkhkkdi tgnpralrrl rtacerakrt lsstaqtie ieslyegidf
 301 yatitrarfe elnmdlfrrc mepvekclrd akmdkqihd vvlvggstri pkvqqllqdf
 361 fngkelcksi npdeavayga avqaailsge gnqrvqdlll ldvtpslslg etaggvmtvl
 421 iprnttiptk keqvfstysd nqpgvliqvy egertrtkdn nllgkfeltg ippaprgvpq
 481 invtfdidan gilnvsaedk ttgkknkiti tndkgrlske eiermvqae kykaedeqvr
 541 hkvearnale nyaynmrntv rdekiasklp addkkkieda iedaikwldg nqlaeade
 601 dkmkeleslc npiiskmygg gaggpagmde dapngsagt ggsgagpkie evd

10

(配列番号12)

【0350】

イネの内乳組織（内乳の管腔の結合タンパク質 [イネ (*Oryza sativa*)]
) BiPからのAAB63469 BiP同族体を、約0.09%の重量/重量でCell
 lastimにおける組み換え型のアルブミンで生じることを見出した。その完全なアミ
 ノ酸コード配列を以下のように提供する：

20

【0351】

【化3】

1 mdrvrgsafllgvllagslf afsvakeetk klgtvigidl gttyscvgvv knghveiian
 61 dqgnritpsw vaftdserli geaaknqaav npertifdvk rdigrkfeek evqrdmklvp
 121 ykivnkigkp yiqvkikdge nkvfsspeevs amilgkmmet aeaylgkkin davvtvpayf
 181 ndaqrqatk agviaglnva riineptaaa iayglldkkgg eknildvdlg ggtfdvsilt
 241 idngvfevla tngdthlgge dfdqrimeyf iklikkkysk diskdnralg klrreaerak
 301 ralsnqhqr veieslfdgt dfsepltrar feelnndlfr ktmgpvkkam ddagleksqi
 361 heivlvvggst ripkvqllr dyfegkepkn gvpndeavay gaavqgsils geggdetkdi
 421 llldvapltl gietvggvm kliprntvip tkksqvftty qdqqttsiq vfegersmtk
 481 dcrllgkfdl sgipaaprgt pqievtfevd angilnvkae dkgtgkseki titnekgrls
 541 qeeidrmvre aeefaeedkk vkeridarnq letyvynmkn tvgdkdklad kleseekekv
 601 eealkealew ldenqtaeke eyeeklkeve avcnpiisav yqrtggapgg rrrgrlddeh
 661 del

30

(配列番号13)

40

【0352】

EEC69073/OsI_37938 [インディカ種 (*Oryza sativa*
Indica Group)] ストロマHSP70を、約0.06%の重量/重量で、C
 elllastimにおける組み換え型アルブミンで生じることを見出した。その完全なア
 ミノ酸コード配列を以下のように提供する：

【0353】

【化 4】

```

1  masftsqlga macgaapsts plaarrsgql fvgrkpaaas vqmrsvpragr argvamrvac
61 ekvvgidlgt tnsavaameg gkptvitnae gqrttpsvva ytkggerlvq qiakrqavvn
121 pentffsvkr figrkmaevd deakqvsyvh vrddngnvkl dcpaigkqfa aeeisaqvlr
181 klvddaskfl ndkitkavvt vpayfndsqr tatkdagria glevlriine ptaaslaygf
241 ekknnetilv fdlgggtfdv svlevgdgvf evlstsgdth lggddfdkfy fcwvfyfgam
301 thetpkvvdw lasnfkkdeg idllkdkqal qrlteaakea kmelstlsqt nislpfitat
361 adgpkhiett lsrakfeelc sdldrlktp vtналrdakl svdnldevil vggstripsv
421 qelvkkitgk dpnvtvnpde vvslgaavqg gvlagdvkdv vlldvtplsl gletlggvmt
481 kiiprnttlp tsksevfsta adgqtsvein vlqgerefvv dnkslgsfrr dgippaprgv
541 pqievkfdid angilsvaaai dkggtgkkqdi titgastlpg devermveea dkfagedkek
601 rdaidtknqa dsvvyqtekq lkelgdkvpa pvkekvdakl nelkeaiagg stqsmkdama
661 alneevmqig qamynqqpna gaagptpgad agptssggkg pndgdvidad ftdsn

```

(配列番号14)

【0354】

これらのタンパク質が、単にアルブミンに相対する *Cell last im* の新しいバッチにおいて低レベルで生じるため、これらの汚染物質が *Cell last im* の新しいバッチの効果を促進するより優れた成長に実際に関与することを確認するための必須条件は、アルブミンに対するこれらの成分の追加 (addition back) が、*Cell last im* における各々の成分に関して実際に確認されるものに匹敵するレベルで、アルブミンの活性を促進する成長を修復するか促進するかどうかを測定することである。

【0355】

＜実施例6：親和性クロマトグラフィーによる組み換え型アルブミンからの熱ショックタンパク質の分離＞

方法：新しいプロセス [ロット P0153、P0156、及び／又は P0171] 粉末を使用して生成される *Cell last im* を、およそ 20 g/L で精製水と混合した。結果として生じる溶液を、少なくとも 5 等量の緩衝液により、50 mM のトリス / Cl、pH 7.0 に対して限外濾過した。結果として生じる溶液を ATP アガロースカラムに通し、結果として生じるフロースルーを画分 A として標識化した。カラムを 5 カラム体積の平衡緩衝液で洗浄し、ATP アガロースに結合する材料を 50 mM のトリス / Cl、1 M の KCl、pH 7.0 で溶出した。溶出した材料を、画分 B として標識化した。洗浄を画分 C として続けた。画分 A を 100 g/l まで直接濃縮し、d-PBS で限外濾過した。画分 B を、更なる分析のため、50 mM のトリス / Cl において 20 倍又は 100 倍にまで著しく濃縮した。洗浄画分 C を更なる参照のために続けた。ウェスタンブロッティング法に関して、10 µg の各々のタンパク質画分 (A280 による、アルブミンの $e.c$ (消衰係数) が $0.53 \text{ cm}^2/\text{mg}$ であり、Hsp70 の $e.c$ が $0.41 \text{ cm}^2/\text{mg}$ である場合) を、2X SDS の添加液における 4-20% の SDS PAGE ゲルに充填した。サンプルを充填前に 80 °C でおよそ 5 分間加熱した。分離を 200 V (定電圧) で行い、およそ 90 分間行った。結果として生じるゲルを 30 分から 2 時間の間、水ですすぎ、次に、タンパク質を 2 時間 30 mA (定電流) で、ニトロセルロース膜に移した。結果として生じるプロットは、転送制御として分子量マーカータンパク質を含み、次に、水中の 5% (w/v) の粉乳において遮断された。主要な単クローン抗体 (マウス抗ウシ Hsp70 (Sigma / Aldrich #H5147)) を、5% のミルク溶液対プロット (1:2500) に加え、プロットを 4 °C で一晩、温和な揺動によりロッカー (rocker) 上でインキュベートした。その後、プロットを、TDN、及び 1:2500 の希

釈に加えられた5%の乳溶液中の二次的な抗体（結合したピラス抗マウスHRP）において各々10分間、4回洗浄した。4℃で2～3時間のインキュベーションの後、ブロットを、各々10分間TDNで4回洗浄した。その後、結果として生じるブロットを、5分間ピコ（ピラス）化学発光基質によりインキュベートした。コダックの写真用フィルムを暗室でブロットにさらし、後のフィルムを現像し、すすぎ、固定し、すすぎ、乾燥した。フィルム上の分子量マーカー位置の正確な伝送を測定するため、光を発する標識を使用した。

【0356】

結果：結果を図4に示す。撮影されるウェスタンブロットは、分離計画が、A（フロースルー）及びB（ATP結束）画分においてタンパク質の2つの個体群を生成することを示す。出発材料（レーン2）、画分Aフロースルー（レーン3）、画分C洗浄（レーン4）、及び画分B（レーン5）を、単クローン抗体に反応する能力に関して試験した。加えて、陽性対照として役立つ市販のHsp70タンパク質を、最後のレーン（レーン10）に充填した。図4のブロットで示されるように、フロースルー画分A（レーン3）は、有意な量のHsp70を含んでいない。溶出され、濃縮された画分B（レーン4）は、ブロットで示されるような抗体に非常に反応的であり、少なくとも2つの別の帯が75kDaの分子量マーカーに集中することを示す。洗浄画分C（レーン5）は、75kDaよりわずかに下で流れる（run）、2つの帯の存在を示す。別々の独立した実験において、フロースルー画分A（レーン7）は再び、抗体に反応的ではなく、洗浄画分C（レーン8）も抗体に反応的ではないが、レーン9に示されるATP結合タンパク質で濃縮された画分（画分B）は、最初の分離から見られたものと同じ横縞模様を与える。

【0357】

考察：分離プロトコルを、ATPアガロース親和性レジンに結合する能力に基づきHSP70タンパク質を分離するために進行し、その有効性に関して試験した。その手順は、単にATPアガロース、及び緩衝液変化を濃縮及び実行するための限外濾過、及びhspの存在を検出する抗hsp70抗体を使用する、単なる最小のサンプル操作を含んだ。手順（図4）の結果は、10μgの出発原料、10μgのフロースルー、又は10μgの洗浄画分において、ant-Hsp抗体によって検出される不十分なhsp70があることを明確に実証する。対照的に、ATPアガロースカラムから溶出された画分において、抗Hsp70抗体によって明らかに認識される少なくとも2つのタンパク質を含んでいる。それ故、結果は、分離計画が2つの独立したクロマトグラフィー実行（run）及びダイアフィルトレーションに成功し予測可能だったことを示す。更に、データは、ペプチドマスフィンガープリンティングによって作られた熱ショックタンパク質の識別を実証し、これらのタンパク質が機能的であり、単純なATPアガロースクロマトグラフィー、その後ダイアフィルトレーションによって容易に分離され、濃縮されたことを実証する。熱ショックタンパク質が組み換え型アルブミンにより同時精製することが結論付けられる。そのような同時精製は、熱ショックタンパク質がアルブミンに結合され、アルブミンが安定立体配座において熱ショックタンパク質を安定させるために作用するという仮説と一致している。驚くことに、組み換え型アルブミン／熱ショックタンパク質複合体は、機能熱ショックタンパク質（function heat shock proteins）の存在と一致する著しいATPアーゼ活性（示されないデータ）を保持する。この増加した活性を、下記に述べられるような効果を促進する成長を提供するものと更に確認した。

【0358】

＜実施例7：細胞の生存率上のCelllastimからのHspsの除去の影響＞

方法：実施例6に記載の分離計画も、細胞培養検査（図5）に適している画分Aを生成するために使用した。ATPアガロースカラムを通して流され、その後ダイアフィルトレーションによって濃縮され、細胞培養に適しているPBSにより緩衝されるため、方法は画分Aの最小の操作を含む。方法の意図は、実験に新しい変数を導入しないことであり、その結果、生存率の喪失が見られるが、幾つかの他の理由により、あるいはATP結合タンパク質の除去を越えて引き起こす。画分Aを、ハイブリドーマ細胞培養生存率を促進す

る能力に関して、純粋な対照（出発材料）に対して試験した。試験の結果を図5に示す。

【0359】

結果：図5に示されるように、Cellastim出発材料（平行線模様の棒）、また部分A（固体の棒（solid bars））を、同じ濃度で試験し、陰性対照（縞模様の棒）と比較した。統計的に有意な減少は、試験される4つの濃度すべてに顕著である。結果は、ATPアガロース処理の後にCellastimのパフォーマンスにおいて著しい損失があったことを示す。処理は、ATP結合タンパク質の除去の前に、Cellastimと比較して、28.0、21.7、26.7、及び79.5%の損失をもたらした。この実験において、注意（care）は、サンプル処理によりパフォーマンスの任意の不意な損失を保証するためのサンプルの設計及び処理において払われ、あるいは新しい汚染物質の偶発性の導入が最小限にされた。

10

【0360】

考察：細胞培養結果（図5）は、単にATP結合カラムに通すことにより、Cellastimのパフォーマンスを減少させることが可能であることを実証する。このデータは、実施例5において示される結果と組み合わせた時、ATPアガロースカラムによるアルブミンからのhspの枯渇が、アルブミンの特性を促進する細胞増殖を直接減少させることを実証する。それ故、この結果は、アルブミンのより優れた特性が、少なくとも一部で、アルブミンにおける汚染熱ショックタンパク質から生じることを実証する。

【0361】

〈実施例8：振とう培養における細胞増殖及び生存率に対する効果の分析〉

20

細胞が、フラスコ及びバイオリアクターを振り混ぜることにより高密度で成長するときに、細胞増殖と生存率への本発明の補足物の効果を測定するため、一連の研究を直接比較した。

【0362】

方法：ヒト化単クローン抗体を発現するCHO K1細胞を、研究前に、10mg/Lのインスリンを含む無血清の塩基培地（SFM4CHO, Thermo Scientific Hyclone）に6週間に適応させた。適応された細胞を、バンキング（banking）のため振とうフラスコで成長させた。細胞をバンクし（banked）、DMSO 8%のv/vを有する成長培地で構成された低温保存培地中の液体窒素に保管した。

30

【0363】

振とうフラスコ実験において、細胞を、塩基培地、又は 3.0×10^5 生細胞/mlの濃度で、125ml/振とうフラスコCorning #431405中の30mlの培地において補足物を含む培地に播種した。細胞を、実行の長さに関して110RPMで、加湿されたCO₂インキュベーターにおいて、37℃に維持した。流加回分バイオリアクター実験を、塩基培地、又は補足物を備えた塩基培地において、1L又は2LのApplikonバイオリアクター（Applikon Biotechnology, NE）で行なった。細胞を、 3.0×10^5 生細胞/mlで0日目に播種した。バイオリアクター温度、pH及び溶存酸素（DO）を監視し、自動化されたコントローラーによって制御した。リアクター温度を、加熱したブランケットによって37℃に維持した。培養pHを、CO₂又は6%のNa₂CO₃の追加によって7.1に維持した。通気を、10ml/分で円筒状の焼結したスパージャによって行なった。溶解酸素を、培地へO₂を断続的に散布することにより、50%の空気飽和で制御した。攪拌翼の攪拌率を180RPMに維持した。

40

【0364】

培養中に、バイオリアクターサンプルを、オフライン分析のために周期的に得た。生細胞密度（VCD）及び細胞の生存率を、0.4%のトリパンブルーの膜排除、及びBeckman ViCell細胞カウンタにより細胞を数えることによって測定した。幾つかの場合において、生細胞密度及び細胞の生存率を、細胞の生存率死（cell viability die）の排除、Viacount試薬（Millipore）、その後製

50

造業者によって指示されるようなGuava PC^A細胞カウンタ上での分析によって測定した。グルコース、及びラクタートの濃度を、Nova 400 Bioprofile analyzerを使用する標準臨床分析を使用して測定した。特異的な純成長率及び特異的な純死亡率を、Gaudy et al. (Gaudy, AF, A. Obaysahi, and E. T. Gaudy. 1971. Applied Microbiology, 22(6): p. 1041-1047)によって測定した。抗体の濃度を、製造業者の指示(Bethyl Laboratories)に従って抗ヒトIgG ELISAによって測定した。培地の補足物は、組み換え型ヒトアルブミン(実施例2に記載されるようなCellastim)、又は組み換え型ヒトラクトフェリン(rLF、Lacromin(L))、或いは両方のタンパク質の組み合わせを含んだ。補足物を、他に示されない限り、0日目に播種する細胞に加える。複数の実験を、特に明記されない限り(except where noted)、上記の同じパラメーター下で、振とうフラスコ及びバイオリアクターシステムの両方において行なった。

【0365】

結果：図6Aは、振とうフラスコにおける補足された又は補足されていない(対照)塩基培地で成長する細胞の生細胞密度VCDを示す。この実験において、細胞を、塩基培地又は 3.0×10^5 の生細胞/mlの濃度で、125ml/振とうフラスコ(Corning #431405)中の30mlの培地において、補足物を含む培地で播種した。細胞を、実行の長さに関して110RPMで、加湿したCO₂インキュベーターにおいて、37℃に維持し、Cellastim、又は0日目からのCellastimとラクトフェリンの1:1の混合物のいずれかの示された濃度の存在又は欠如下で成長した。図は、細胞がより高密度にまで成長し、補足されていない培地と比較して、本発明の補足物を備えた培地においてより高密度で残ったことを示す。驚くことに、この実験において、生存率を、500mg/mlのCellastimと同様に、250mg/mlのCellastimの濃度に維持した。図6Bは、振とうフラスコに存在する生細胞の割合(%生存率)を示す。データは、補足物が培地に存在する場合に、細胞がより高い生存率を維持したことを示す。したがって、本発明の補足物は、補足物の欠如下で成長する対照細胞が比較される実験の期間を通じて、完全な生細胞密度及び細胞のパーセンテージ生存率の両方を増加させた。図7Aは、補足された及び補足されない対照培地において、振とうフラスコ中の成長曲線の異なる相における細胞の比増殖速度を示す。補足された細胞が0-8日を通じて陽性の成長率を維持した一方で、特異的な純成長率は、補足されていない培養において5-8日目でかなり減少することに注意する。図7Bは、成長曲線の3つの相の間に細胞の特異的な純死亡率を示す。補足されていない培地で成長する細胞が、5-8日の間に最大ピーク死亡率に達したことに注意する。補足物を備えた培地で成長する細胞は、補足されていない対照インキュベーションと比較して、9-10日目で、その後最大の死亡率に達した。

【0366】

〈実施例9：細胞の生存率及び密度並びに生成物の生成に与える補足物の効果〉

方法：細胞を、塩基培地、又は 3.0×10^5 の生細胞/mlの濃度での125ml/振とうフラスコ(Corning #431405)における30mlの培地において、補足物を含む培地に播種した。細胞を、実行の長さに関する110RPMで、加湿したCO₂インキュベーターにおいて、37℃に維持し、Cellastim、又はCellastimとラクトフェリンの1:1の混合物のいずれかの示された濃度の存在下又は欠如下で成長した。この実験において、補足物を0日目に加え、栄養の追加免疫(nutrient boost)(飼料)を、製造業者(効果的な飼料A、Invitrogen)の指示に従って4日目に加えた。

【0367】

結果：4日目に栄養素飼料により追加免疫された時、振とうフラスコ中の補足されない及び補足された培地におけるCHO-K1の成長特性を、図8Aに示す。グラフは、補足されていない対照と比較して、16日目で補足物を伴う培地において成長する時、細胞が

より高い細胞密度を獲得したことを示す。図 8 B は、補足されていない対照と比較して、4 日目で栄養素飼料により追加免疫された時、振とうフラスコに存在する生細胞の割合（% 生存率）を示す。データは、本発明の補足物が 4 日目に栄養素飼料に加えて使用される培地に存在した時、細胞がより高い生存率を維持したことを示す。図 9 A は、補足されていない対照フラスコと比較して、4 日目に栄養素飼料により追加免疫される補足物において、振とうフラスコ研究における成長曲線の異なる相における細胞の比増殖速度を示す。補足された細胞が、0 - 8 日を通じて陽性の成長率を維持したことに注意する。図 9 B は、成長曲線（4 日目に栄養素飼料により追加免疫される）の 4 つの異なる相の間の、細胞の特異的な純死亡率を示す。補足された培地で成長する細胞が、12 - 16 日目により低い細胞死を示したことに注意する。図 9 C は、振とうフラスコ中の補足された及び補足されていない対照培地において成長する CHO K1 によって生成された、抗体生成物の濃度を示す。培地における単クローン抗体（MAb）濃度は、補足された培地においてより高かった。細胞によって生成され、培地へ分泌される抗体の濃度を、それらの手順（Bethyl Laboratories）に従った抗ヒト IgG ELISA によって測定した。

10

【0368】

〈実施例 10：有害事象からの保護〉

方法：細胞を、塩基培地、又は 3.0×10^5 の生細胞 / ml の濃度での 125 ml / 振とうフラスコ（Corning # 431405）における 30 ml の培地において、補足物を含む培地に播種した。細胞を、実行の長さに関する 10 RPM で、加湿した CO₂ インキュベーターにおいて、37℃に維持し、Cellastim、又は Cellastim と ラクトフェリンの 1 : 1 の混合物のいずれかの示された濃度の存在下又は欠如下で成長した。この実験において、説明されない事象は、細胞を伴うバイオリアクターの充填中に細胞死を引き起こした。

20

【0369】

結果：図 10 A と 10 B は、補足物がバイオリアクター操作中に有害事象から細胞を保護することを示す。補足された培地で成長する CHO K1 細胞は、有害事象を乗り越え（survived）、高密度にまで成長し（図 10 A）、高い生存能力（viability）に達した（図 10 B）。補足されていない対照培地で成長する細胞は、成長しなかった。

30

【0370】

〈実施例 11：バイオリアクターにおいて 2 重の栄養素飼料を有する補足物の活性〉

250 mg / L の Cellastim で補足された培地と比較して、補足されていない対照培地で細胞が成長するとき、細胞増殖とバイオリアクターパフォーマンスを比較するために、一連の実験（Exp 4）も、バイオリアクター中で行なった。

【0371】

方法：流加回分バイオリアクター実験は、上述のように、塩基培地、又は補足物を備えた塩基培地において、1 L 又は 2 L の Applikon バイオリアクター（Applikon Biotechnology, NE）にて行なった。培養を、製造業者によって指示されるような栄養素飼料（効果的な飼料 A、Invitrogen）により、3 日目と 7 日目に追加免疫した。したがって、これらのデータは、2 重の追加免疫の飼料ストラテジー（dual-boost feed strategy）と組み合わせた補足物の効果を示す。加えて、pH を第 1 栄養素飼料により 7.2 から 6.8 まで低くした。

40

【0372】

結果：補足された培地で成長する細胞は、補足されていない培地で成長する細胞よりも高い最大の細胞密度にまで成長した（図 11 A）。細胞は、対照培地における 800 万の生細胞 / ml と比較して、補足物により 1100 万の生細胞 / ml の密度に達した。比増殖速度を、成長特性の異なる相のために計算した。図 11 B で示されるように、補足物は、前飼料期間の 0 - 3 日目において最も成長率を増加させた。図 12 A と 12 B は、生細胞の割合、及び 3 日目と 7 日目に 2 重の栄養素の追加免疫を使用する、補足された及び補

50

足されていない培地を伴うバイオリアクターで成長するCHO K1細胞の特異的な死亡率を示す。細胞のより高い密度にもかかわらず、補足されて成長する細胞は、13日目を通じて大多数の高い生存率を維持した。また、特異的な死亡率は、細胞のより高い密度にもかかわらず、13日目を通じて類似していた。図13Aと13Bは、補足された及び補足されていない培地を使用するバイオリアクターで成長するCHO K1に関するpHとモル浸透圧濃度傾向 (osmolality trends) を示した。細胞を、3日目 (pHが7.10から6.8まで低くなった時点) に供給した。pHを、7日目に第2飼料によって6.8に維持した。図13Aは、補足物がバイオリアクター内のpHの調節に悪影響を及ぼさず、pH制御が維持されたことを示す。図13Bは、補足された及び補足されていない培地において成長する細胞のモル浸透圧濃度傾向を示す。補足された培地のモル浸透圧濃度は、補足されていない培地よりも低く、300の標準のモル浸透圧濃度により近かった。このデータは、補足物がより低いモル浸透圧濃度を都合よくもたらしたことを示す。図14AとBは、バイオリアクター (3日目及び7日目に栄養素飼料を伴う) 中の補足された及び補足されていない培地において成長するCHO K1に関するグルコース及びラクタート傾向 (glucose and lactate trends) を示す。グルコースレベルは、補足された及び補足されない培地において類似した。しかしながら、ラクタートのレベルは、補足物を備えた培地において都合よくより低かった。図15AとBは、3日目及び7日目に栄養素飼料を伴うバイオリアクター中の補足された及び補足されていない培地において成長する、CHO K1細胞の特異的なグルコース消耗及び特異的なラクタート消耗を示す。データは、補足された培地において細胞がより少ないグルコースを都合よく消耗したことを示す。データはまた、補足された培地において細胞がより少ないラクタートを都合よく生成したことを示す。図16AとBは、3日目及び7日目に栄養素飼料を伴うバイオリアクター中の補足された及び補足されていない培地において成長するCHO K1細胞の、生成される抗体の濃度及び抗体の比生成性を示す。補足された培地において細胞が成長する時、生成された抗体の濃度はかなり高かった。補足された及び補足されていない培地において細胞が成長する時、抗体の特異的な生成は類似した。

10

20

【0373】

〈実施例12：接種材料での、又は栄養素飼料を伴う補足物の比較 (EXP4振とうフラスコ研究)〉

30

方法：CHO K1細胞を、125mlの振とうフラスコ中の30mlの培地における 3.0×10^5 の生細胞/mlにて、上述のような培地へ播種した。これらの実験において、細胞に、3日目及び7日目に栄養素飼料を与えた (製造業者によって指示されるように、効果的な飼料A、Invitrogen)。補足物を、0日目に細胞の接種材料 (innoculum) に加え、又は3日目に第1栄養素飼料に加えた。

【0374】

結果：データ (図示せず) は、補足物が0日目対3日目に加えられてもそうでなくても、グルコースレベル、モル浸透圧濃度、pH、ラクタートレベル又は生成、グルコースレベル又はグルコース消耗における違いがほとんどないことを示した。しかしながら、補足物が接種材料に加えられた時、後期 (11日目) の始めに、生成性に適度の改善があった。表E7は、補足物が0日目に加えられ、又は3日目に供給された時、CHO K1によって生成されるパーセント改善生成物を示す。補足物が無いものと比較して、より多くの生成物が補足物により生成され、及び細胞の接種材料を有する補足物を加えることにより、飼料を有する補足物を加えることと比較して、より多くの生成物が生成された。

40

【0375】

【表 1 4】

表 E7				
	インキュベーション条件			
日	250 接種	250 飼料	対照	% 改善 (250 接種 / 対照)
生成物の濃度				
11日目	334.8	299.6	290.6	15.2 %
16日目	338.7	340	332	2.0 %
容積測定 of 生産性				
11日目	30.4	27.2	26.4	
16日目	21.2	21.3	20.8	
% 改善 (11日目/16日目)	43.8 %	28.2 %	27.3 %	

10

20

【0 3 7 6】

表 E 8 は、振とうフラスコ及びバイオリアクター培養システムにおける様々な実験において、補足された培地で見られたパーセント改善を示す。

【0 3 7 7】

【表 1 5】

表E8. 確認されるパーセント改善(%改善、補足された／対照)

30

ピーク生細胞密度 (VCD):

平均 : 28%, 範囲 : 2 - 47%

【0 3 7 8】

＜実施例 1 3 : 下流の抗体精製への Cellastim 及び Lacromin の影響＞

以下のデータは、Cellastim 及び組み換え型ヒトラクトフェリン (Lacromin) が、培地の補足物として使用された時、細胞の上清から回復した抗体の収量及び全体的な純度に陽性の影響を及ぼすことを示す。

40

【0 3 7 9】

方法：インターロイキン 8 (a-IL*) に対し抗体を生成する CHO K1 細胞は、補足物を備えた、又は上述のような補足物のない成長培地だった。対照培養は、補足されていない培地を使用した。細胞は、3つの補足物のいずれかを備えた培地で成長した：1) 250mg/L の Cellastim、2) 500mg/L の Cellastim、又は 3) 125mg/L の Cellastim 及び 125mg/L のラクトフェリン (Lacromin)。

【0 3 8 0】

図 1 7 A で概略的に示されるように、細胞の生存率が 80 - 50 % に達した時、培地をバッチの末端で細胞から採取した。微粒子の細胞破壊片を、遠心分離と 0.2 のマイクロ

50

フィルターを通す精密濾過によって、採取された細胞培養ブロスから最初に取り除いた。濾液（上清）を、タンパク質Aカラムの2つの大きさのどちらかにわたって処理した：前／後のAKTAパイロットサンプル検査のためのGE-AEKTAprime（1mlのタンパク質Aクロマトグラフィーカラムを有する小規模親和性クロマトグラフィーシステム（GE Healthcare HiTrap（商標） MabSelect（商標） SuRe））、又はGE-AEKTA pilot（100mlのタンパク質Aクロマトグラフィーカラムを伴う親和性クロマトグラフィーシステム（GE Healthcare XK50 MABSELECT（商標） SuRe））。溶出プロファイルの結果を図17Bに示す。

【0381】

タンパク質Aクロマトグラフィーの後、溶出された抗体を、製造業者によって記載されるような10kD GE KVIK（商標）スタートポリエーテルスルホン膜を備えたAEKTAクロスフロー装置を使用して、限外濾過（Diafiltration）によって濃縮した。精製後、抗体を、クーマシーブルー及びシルバー染色を利用して、不純物及び標的タンパク質の存在を検出するため、SDS-PAGEによって分析した。

【0382】

結果：図18は、抗体の精製を示すクーマシーブルー染色での様々な画分のSDS-PAGE分析、及びタンパク質Aクロマトグラフィーによる培地の補足物の成功的な除去を示す。図19は、抗体の精製を示すシルバー染色での様々な画分のSDS-PAGE分析、及びタンパク質Aクロマトグラフィーによる培地の補足物の成功的な除去を示す。補足物のすべての場合において、抗体の精製を高める。これらゲルは、本発明の補足物の使用が、i) 生成物のより高い収量、ii) 正確に折り重ねられた形態；具体的には正確に組まれた多重結合の抗体の重鎖及び軽鎖において濃縮される生成物、iii) 高純度の生成物、iv) 他の内因性の細胞タンパク質によってあまり汚染されない生成物、及びiv) 本発明の補足物なしで作られた生成物のバッチと比較して、細胞のプロテアーゼによってあまり分解されない生成物、を確立する。更に、以下の表E9で示されるように、採取された培地からの抗体の回復も、培地における補足物により改善する。

【0383】

【表16】

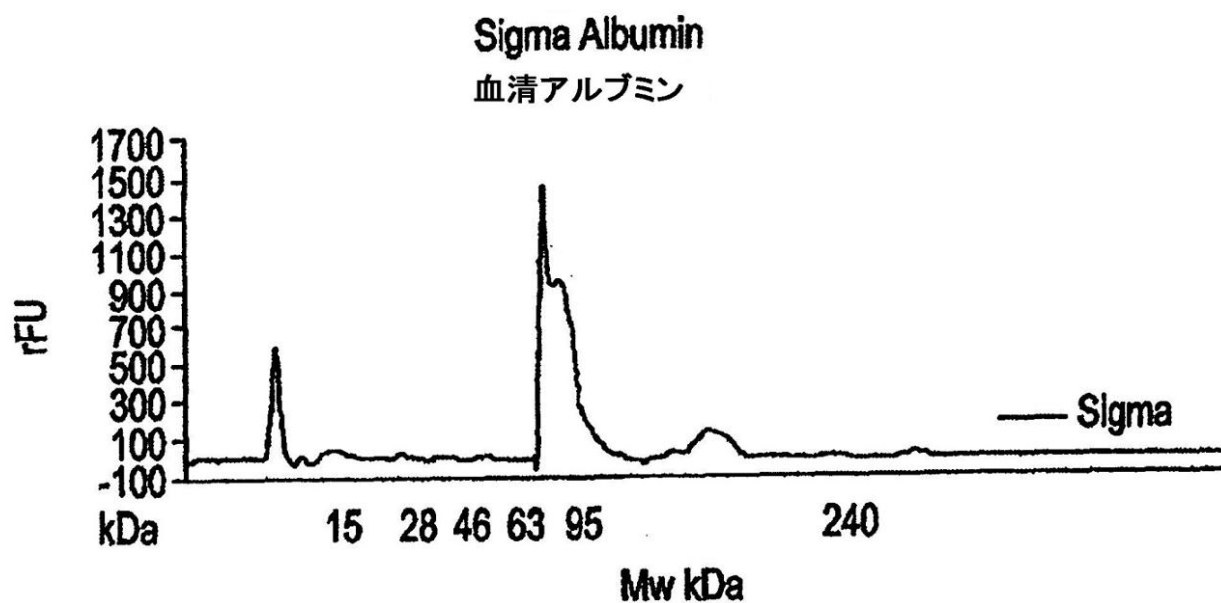
表E9			
サンプル	充填されるIgG の量(mg)	回復されるIgG の量(mg)	% 回復
対照 0 mg /L Cellastim 0 mg/L Lacromin	784	328	41.8
125 mg /L Cellastim 125 mg/L Lacromin	619	321	51.9
250 mg /L Cellastim	537	315	58.7
500 mg / L Cellastim	449	313	69.7

【0384】

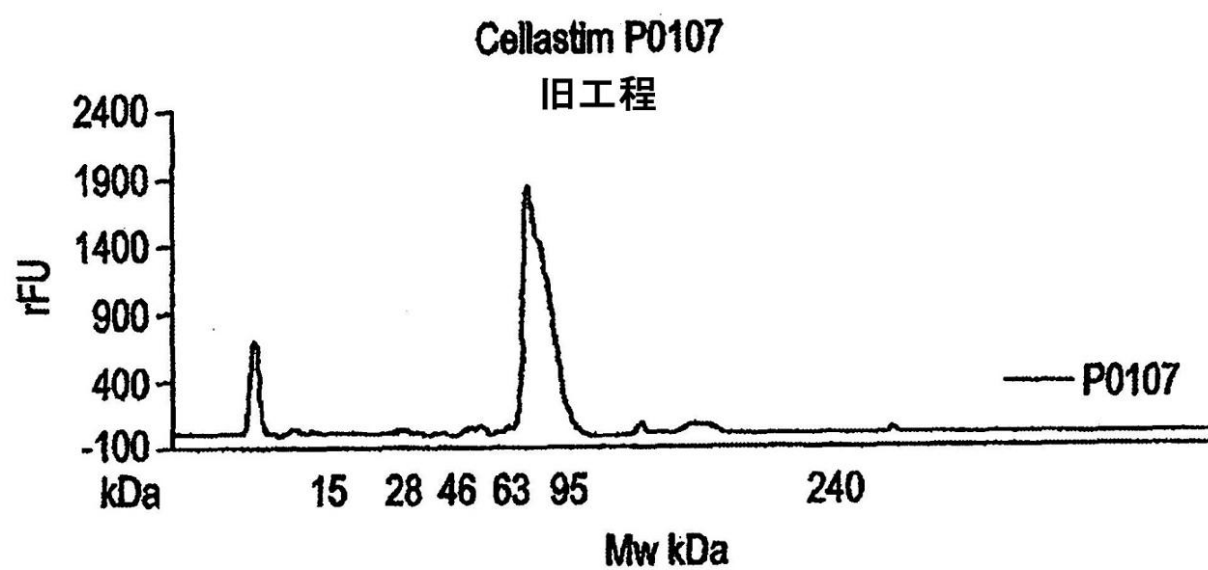
これらのデータは、補足物を異なる濃度で、及び異なる培地の組成物と組み合わせて使用することができ、及びタンパク質Aクロマトグラフィーの後に、生成物回復の純度に対し負に影響を与えることが無い回復の陽性の効果を有することができることを示す。重要なことに、この実施例は、本発明の補足物が、精製工程中の生成物回収の改善、及び精製の各々の工程中にあまり汚染されていない細胞タンパク質を含む生成物による、生成物精

製の改善のより優れた方法を提供することを実証する。このような生成物は、改善された生物活性、安定性を示すと予想され、及び本発明の補足物なしで作られる生成物と比較して、あまり免疫原性及び異質遺伝子型でないことが予想される。

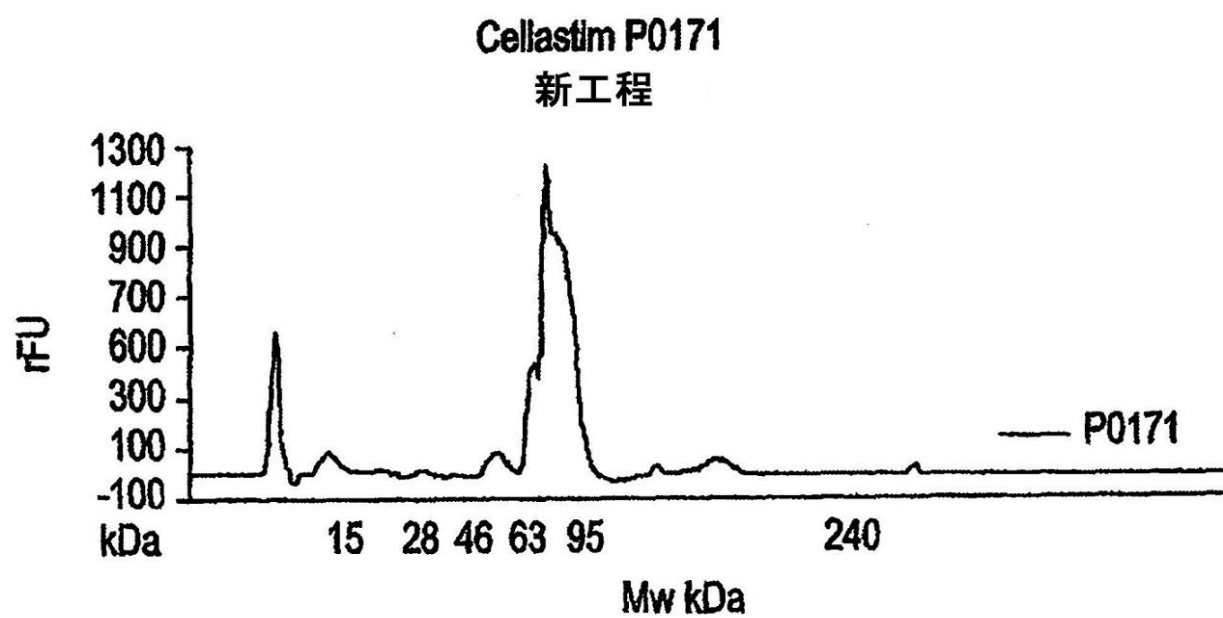
【図 1 A】



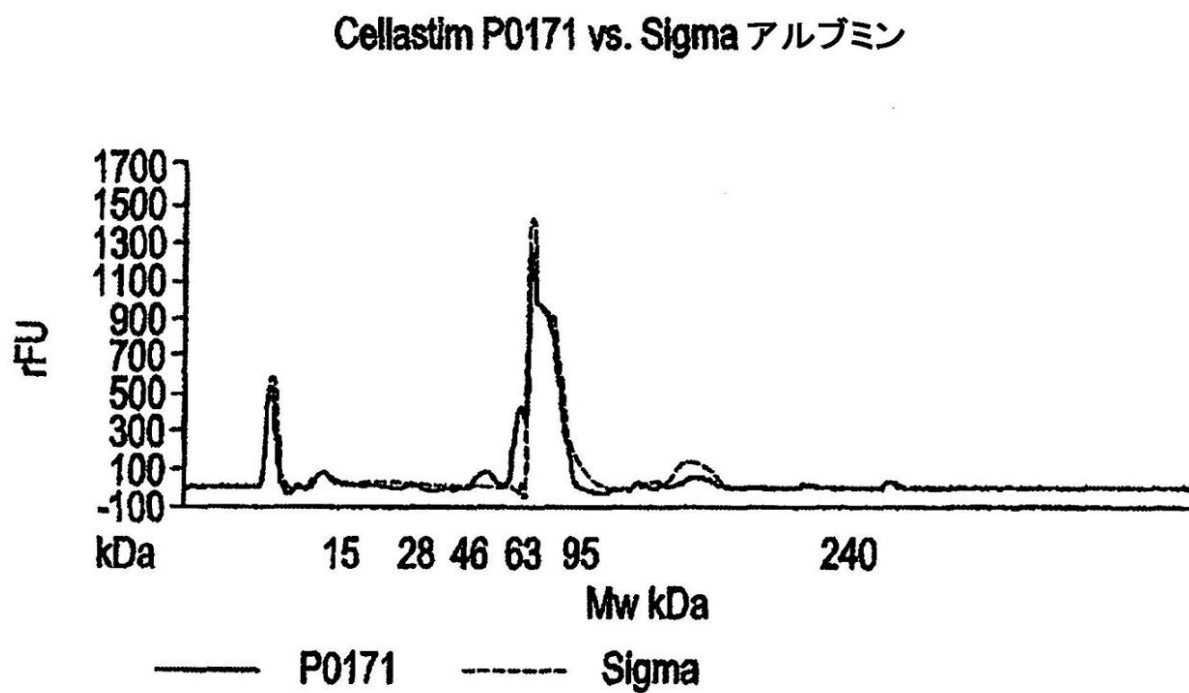
【図 1 B】



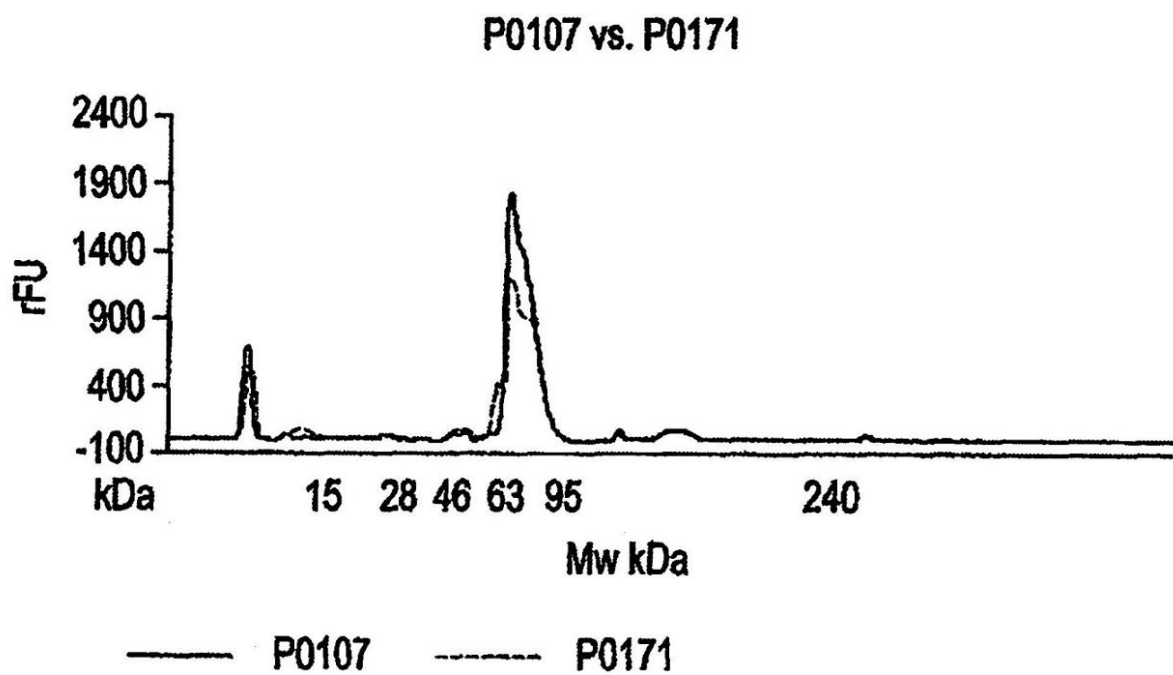
【図 1 C】



【図 1 D】



【図 1 E】

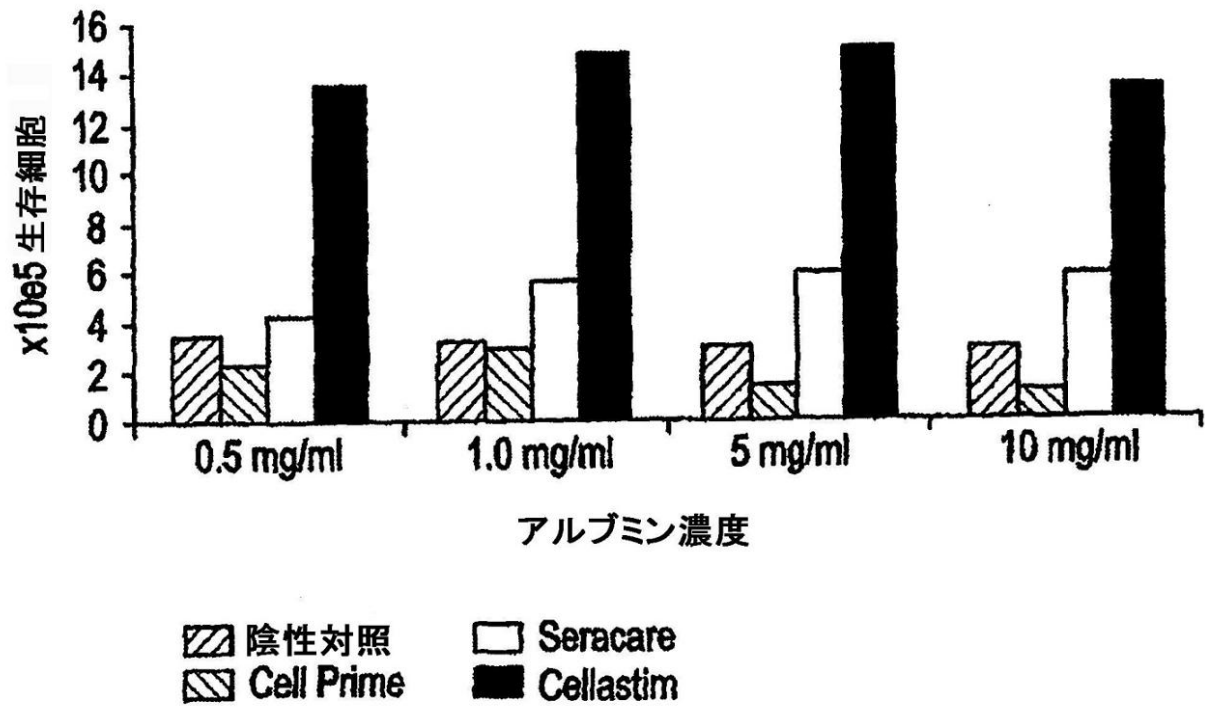


【図 2】

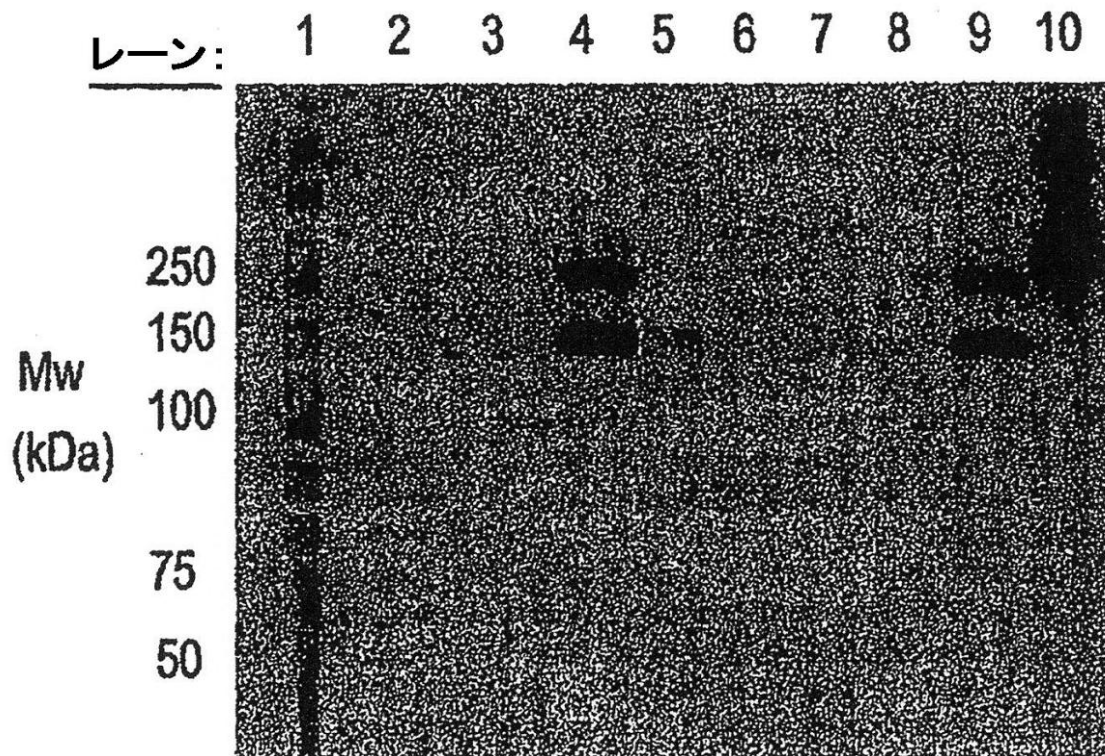


【図 3】

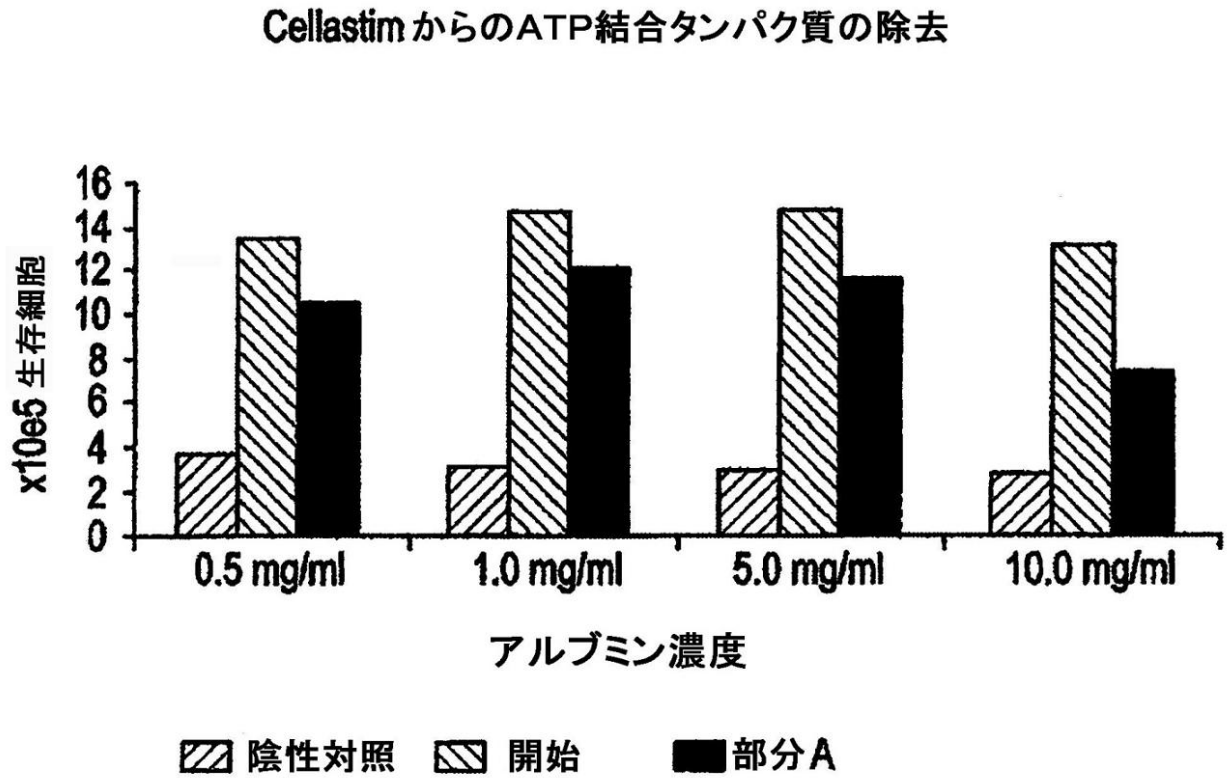
細胞培養中の Cell Prime、Seracare、および、Cellastim アルブミン



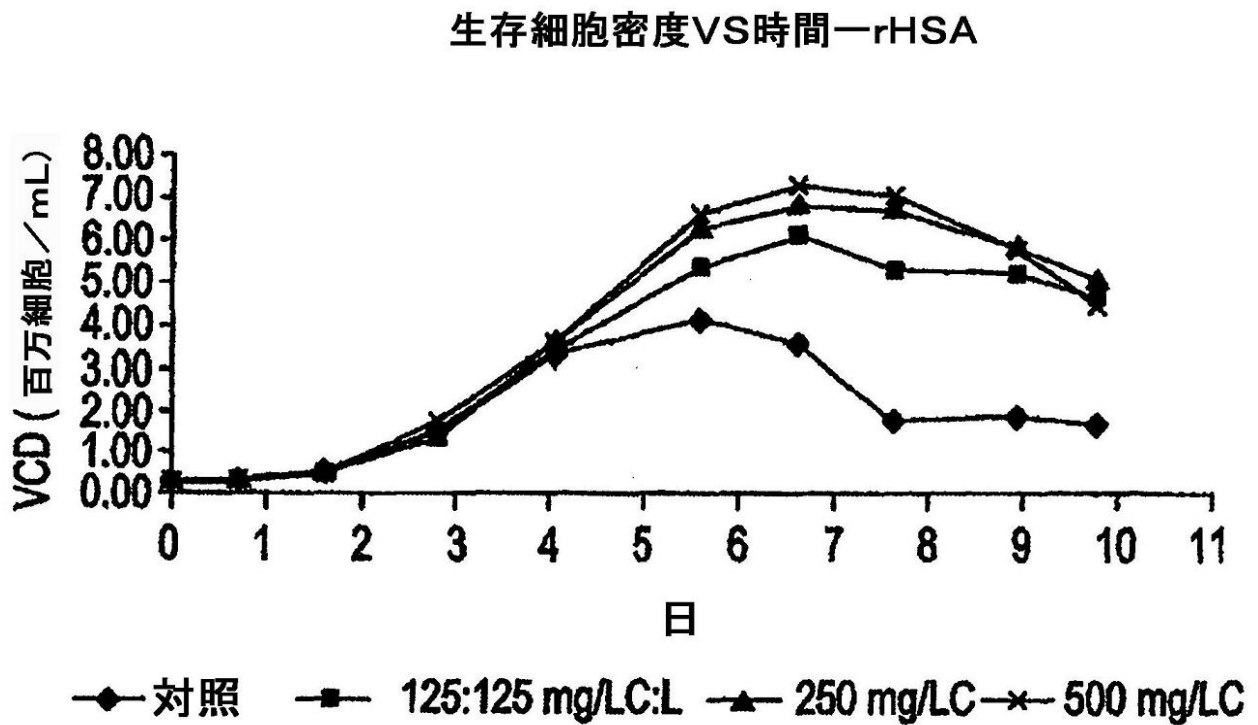
【図 4】



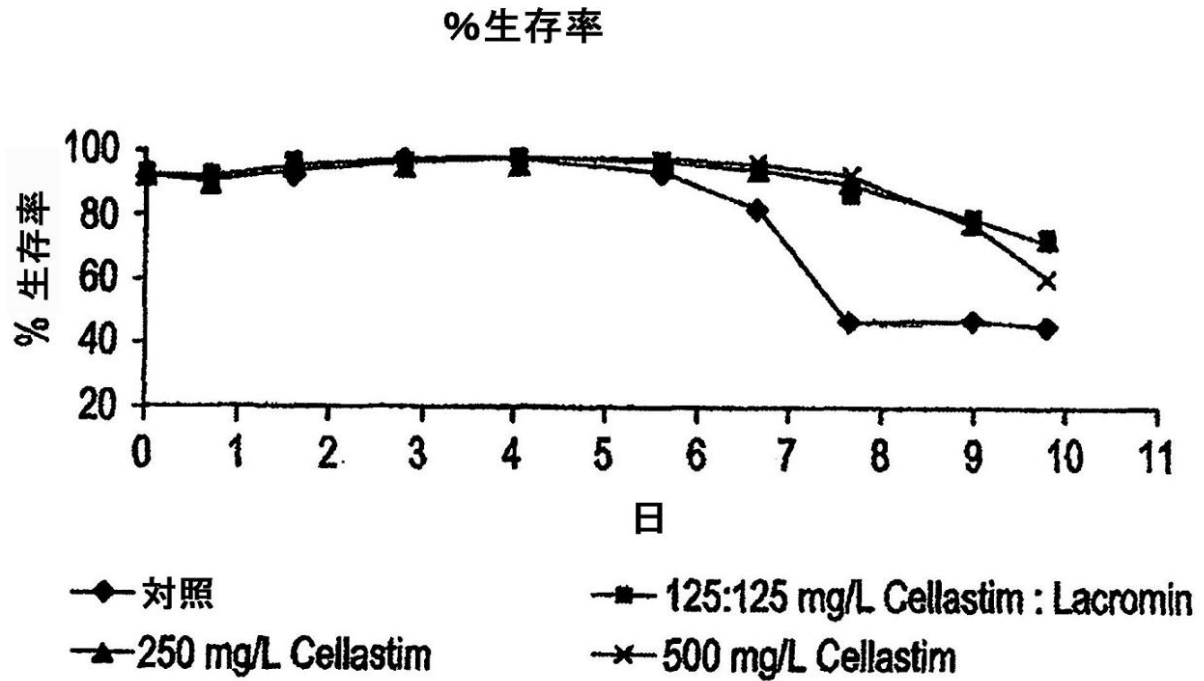
【図 5】



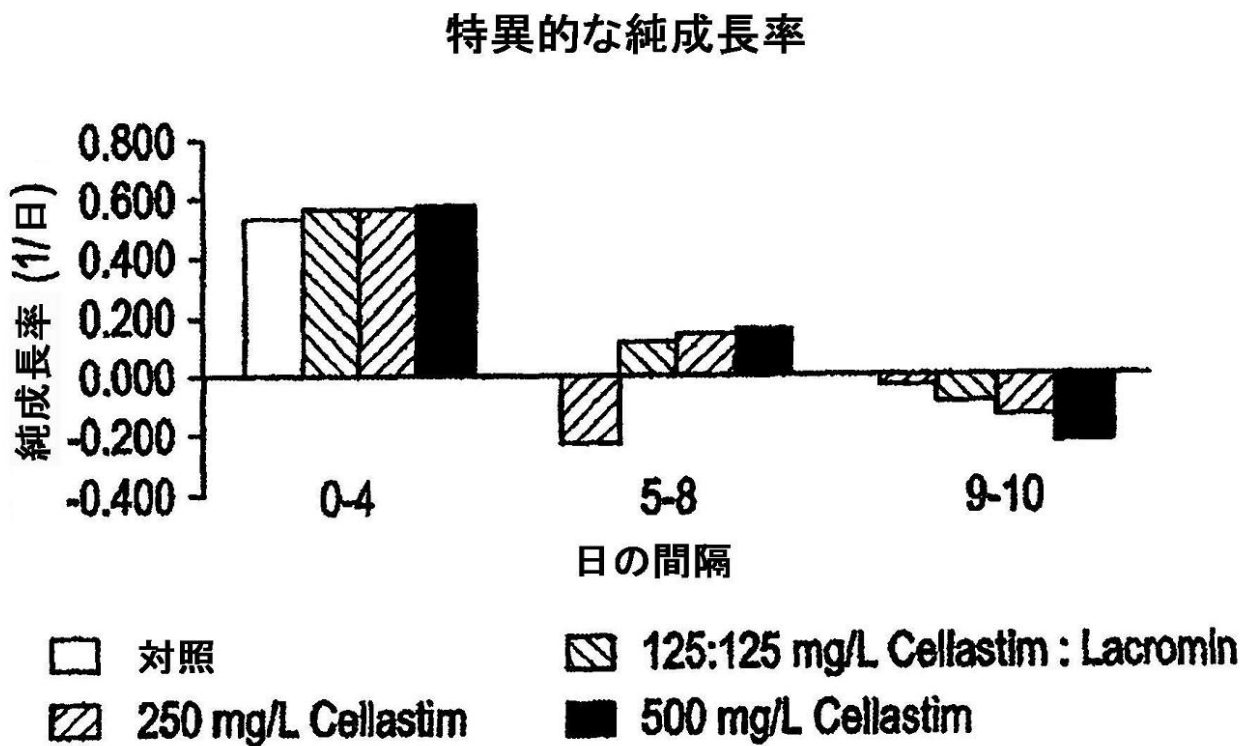
【図 6 A】



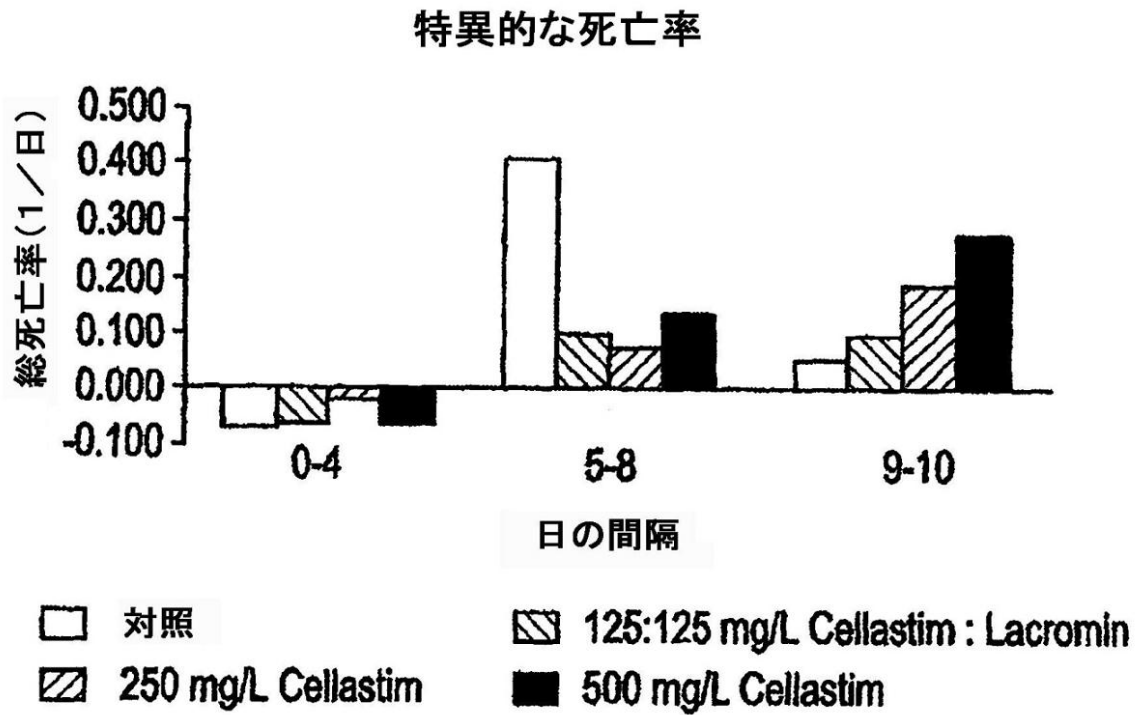
【図 6 B】



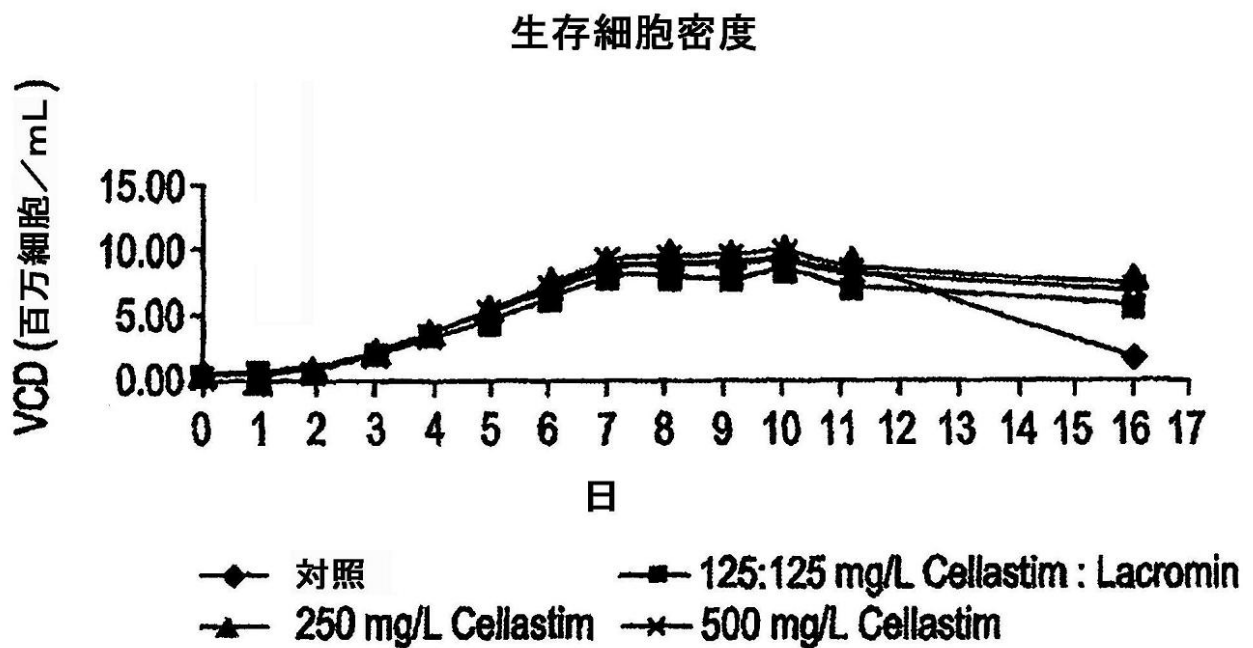
【図 7 A】



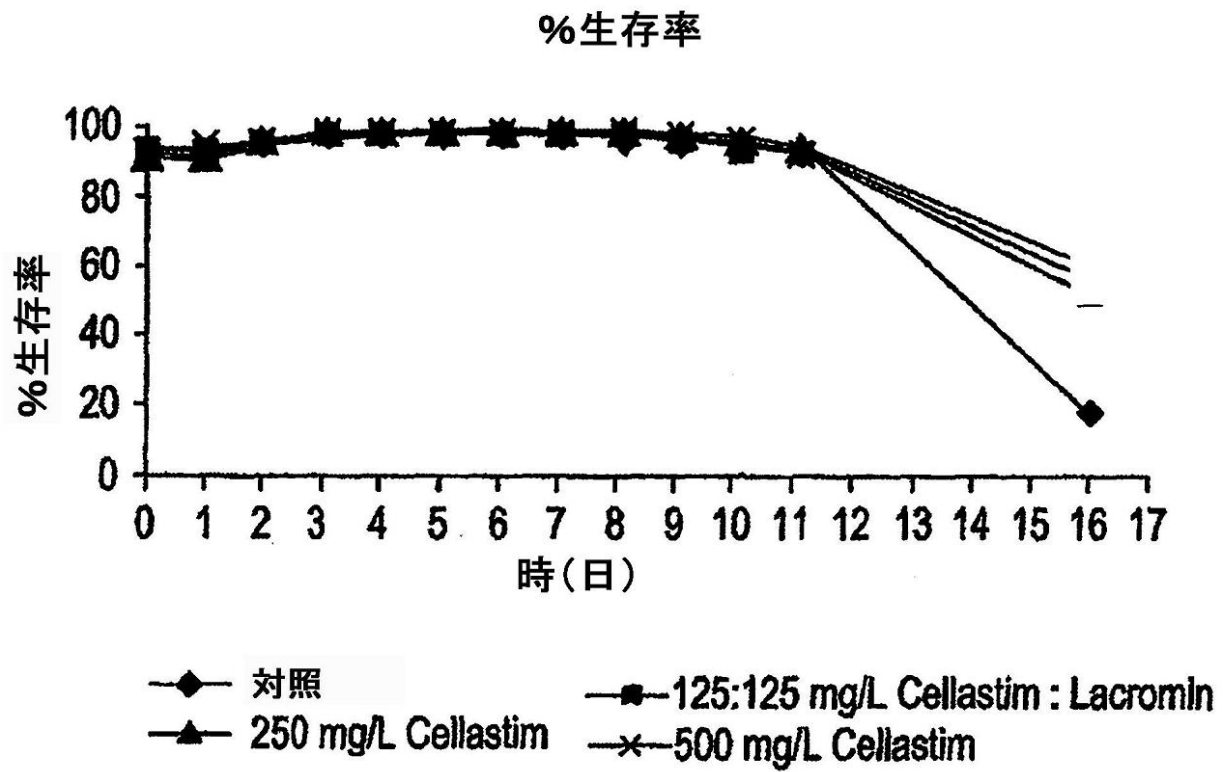
【図 7 B】



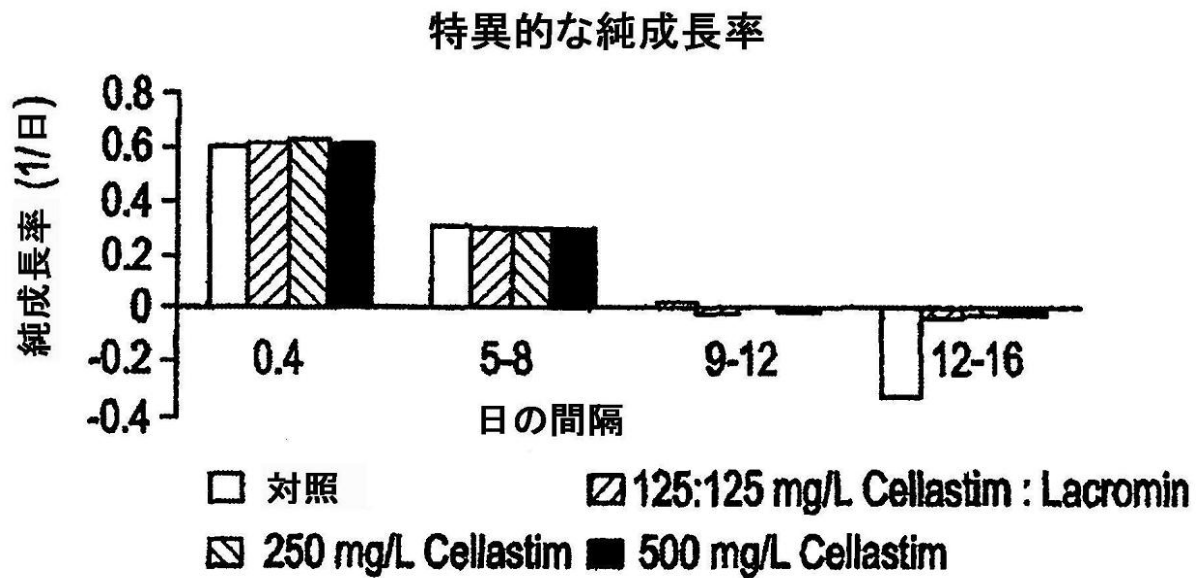
【図 8 A】



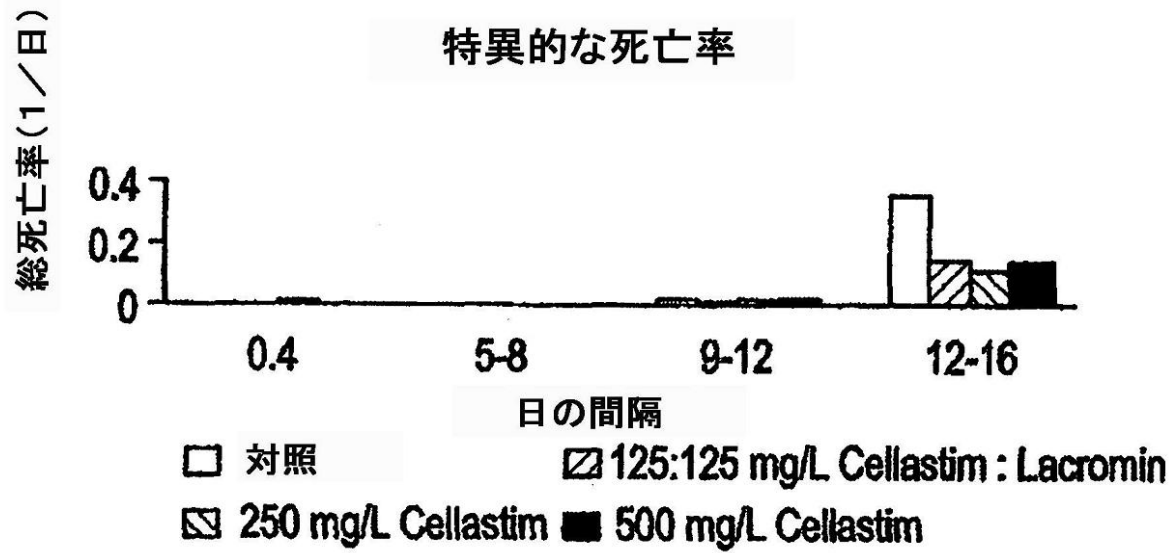
【図 8 B】



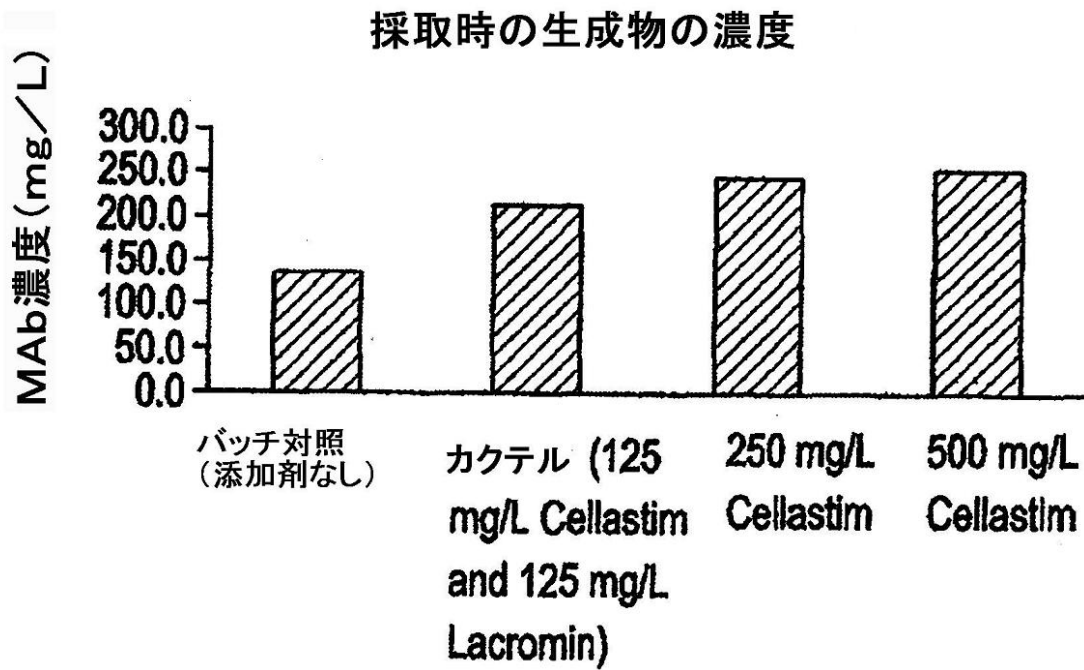
【図 9 A】



【図 9 B】

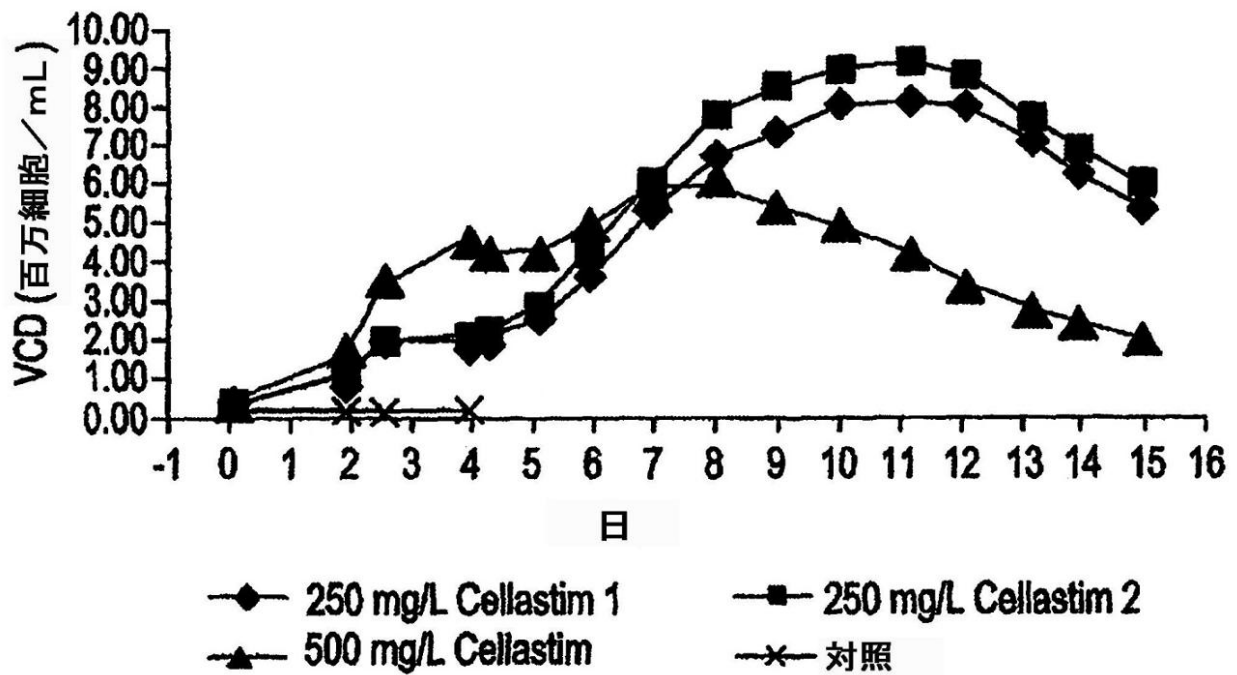


【図 9 C】



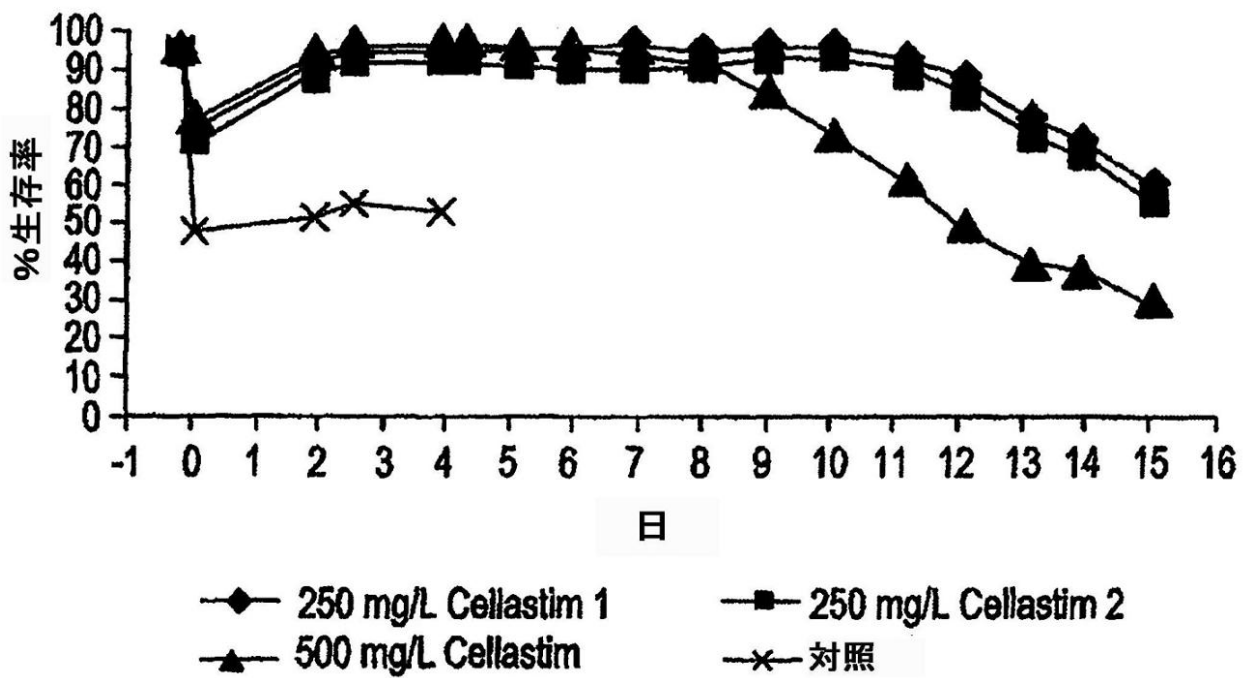
【図 10 A】

バイオリアクター生存細胞密度



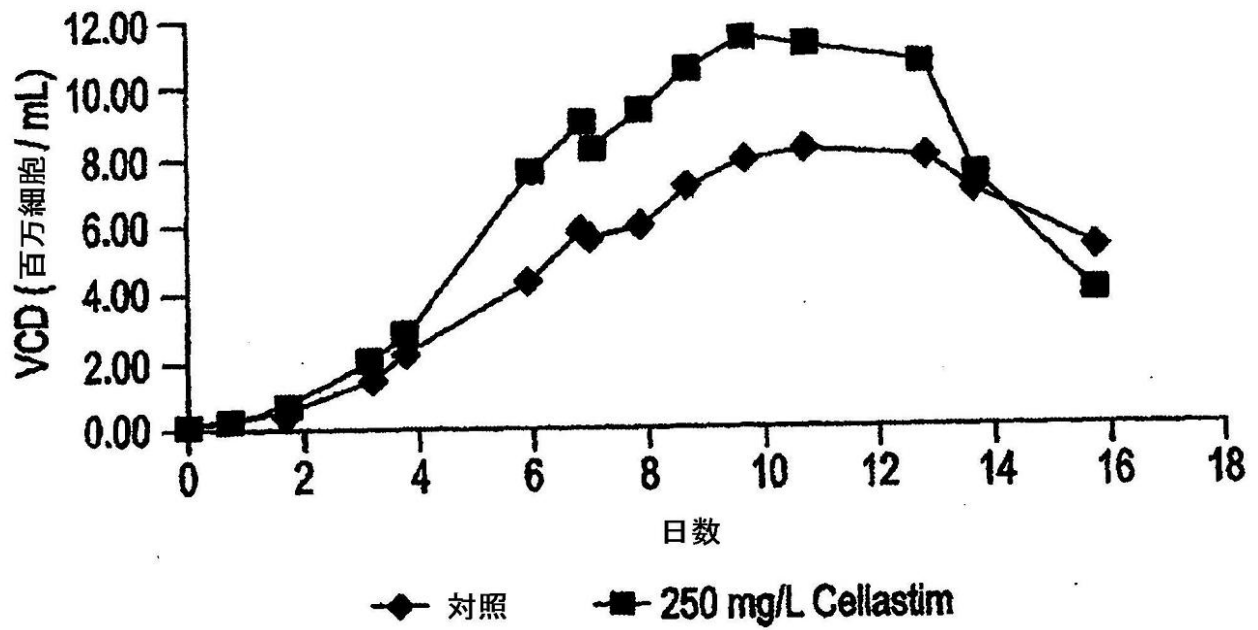
【図 10 B】

バイオリアクター%生存率



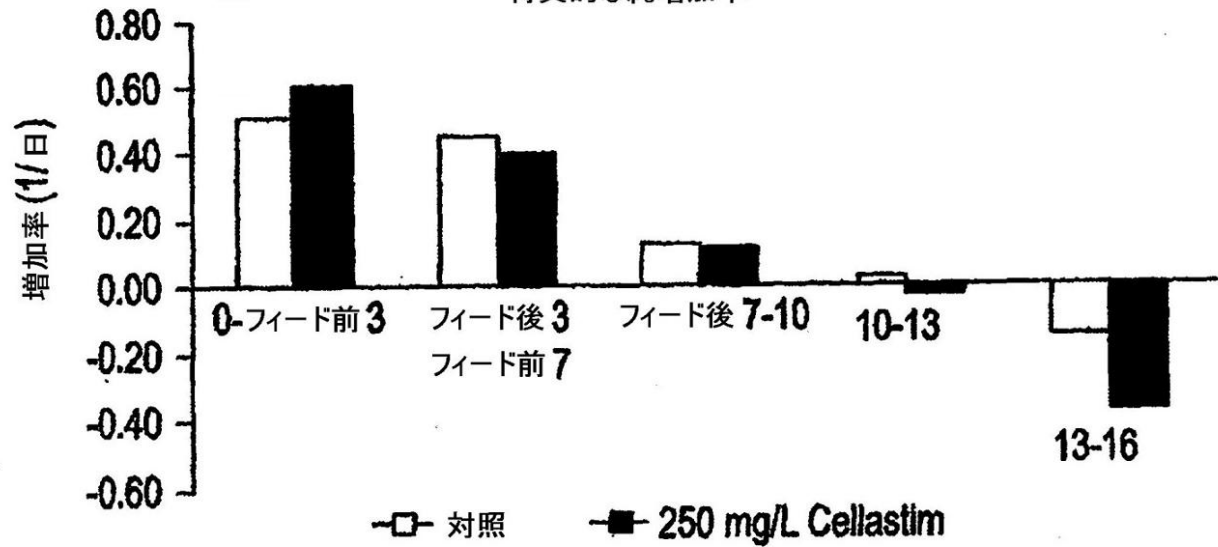
【図 1 1 A】

生存細胞密度平均 (EXP 4) バイオリアクター



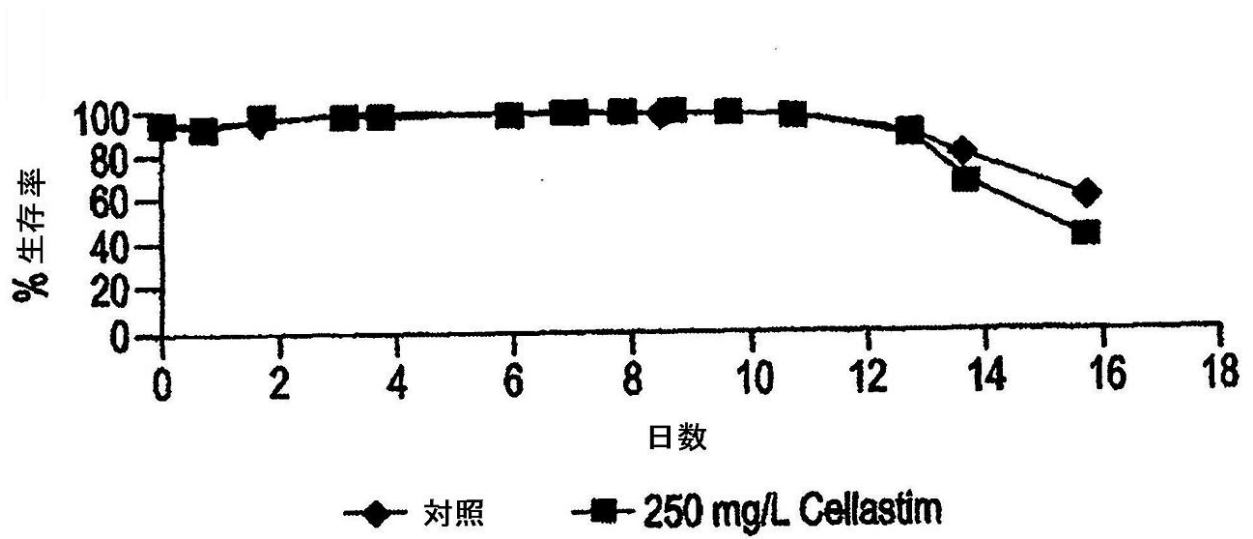
【図 1 1 B】

特異的な純増加率



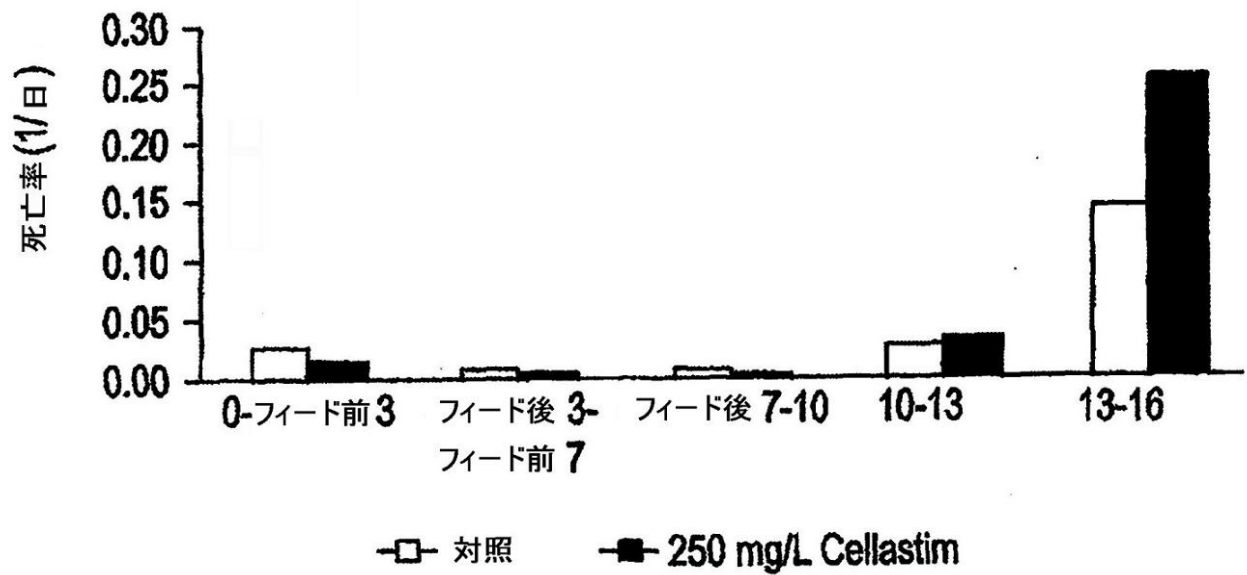
【図 1 2 A】

%生存率平均 EXP4 バイオリアクター

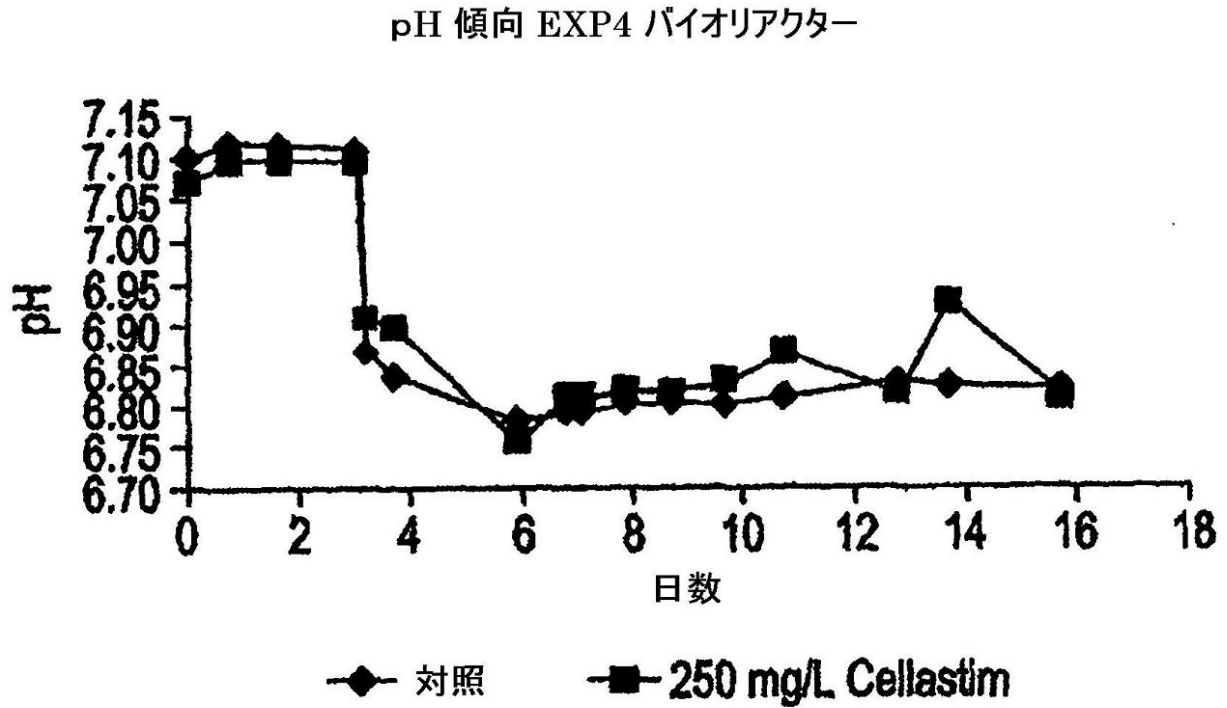


【図 1 2 B】

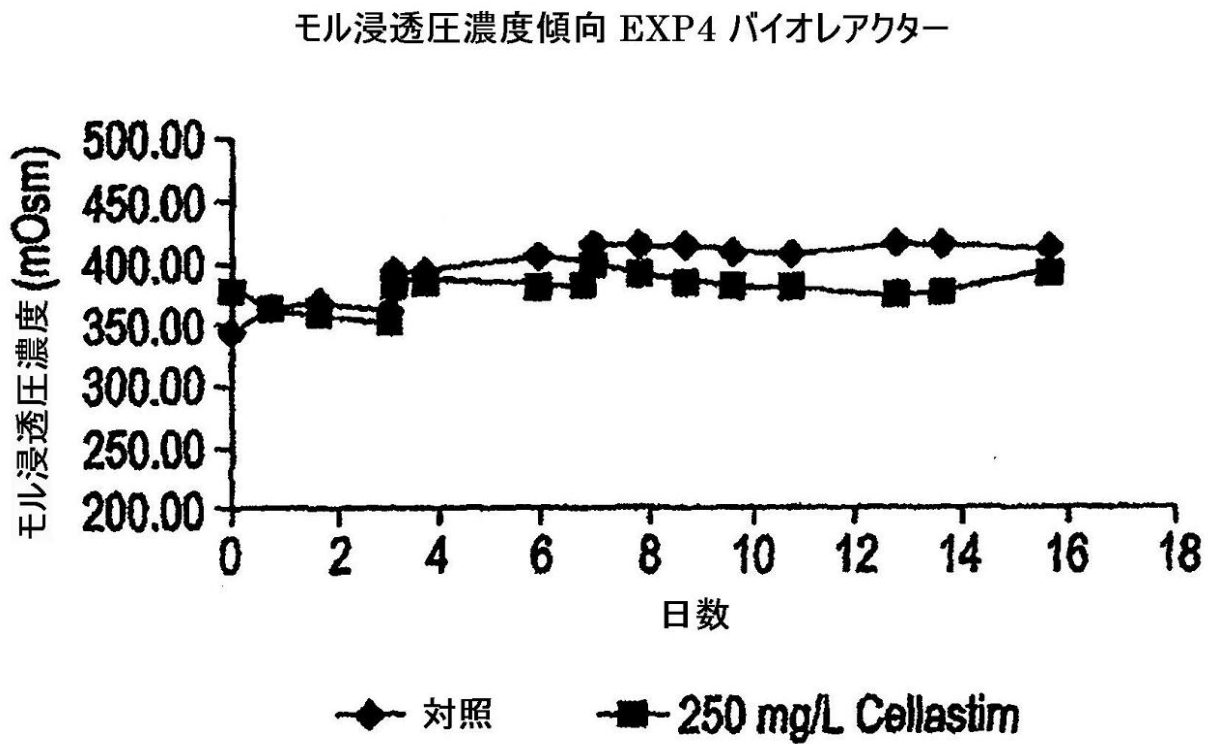
特異的な死亡率



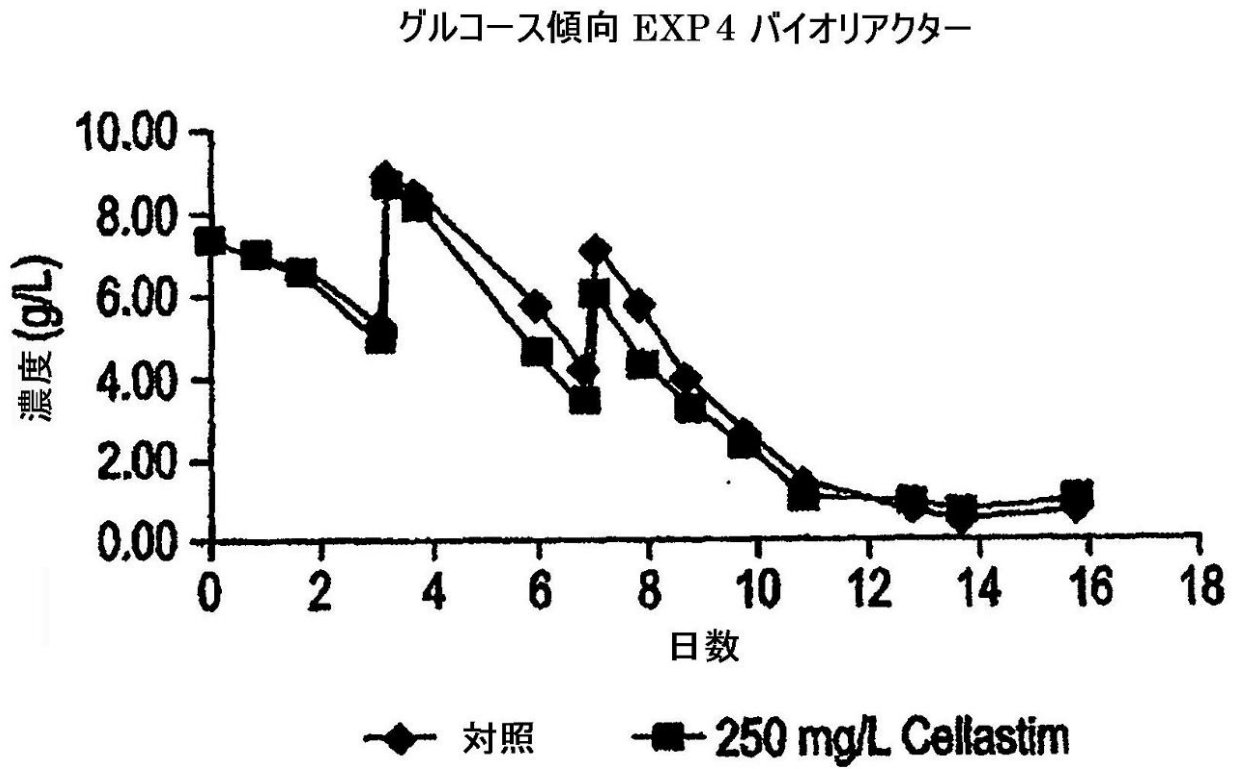
【図 1 3 A】



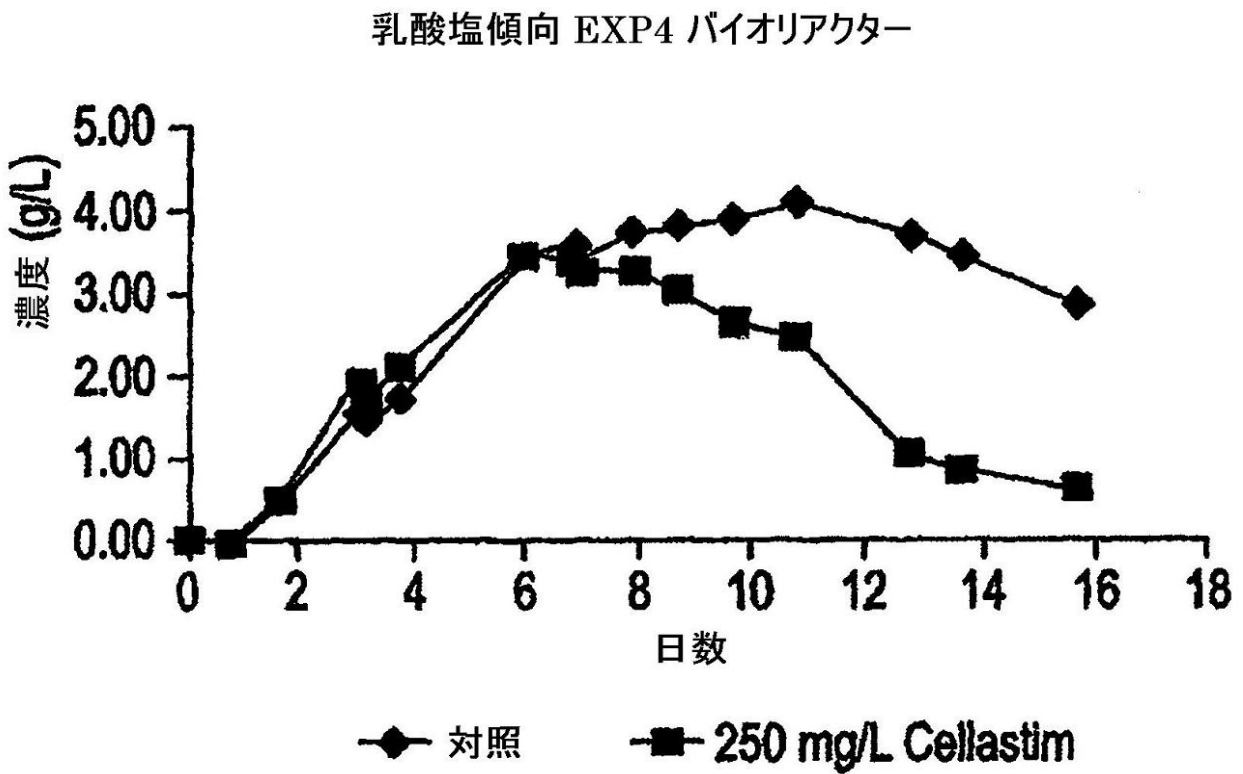
【図 1 3 B】



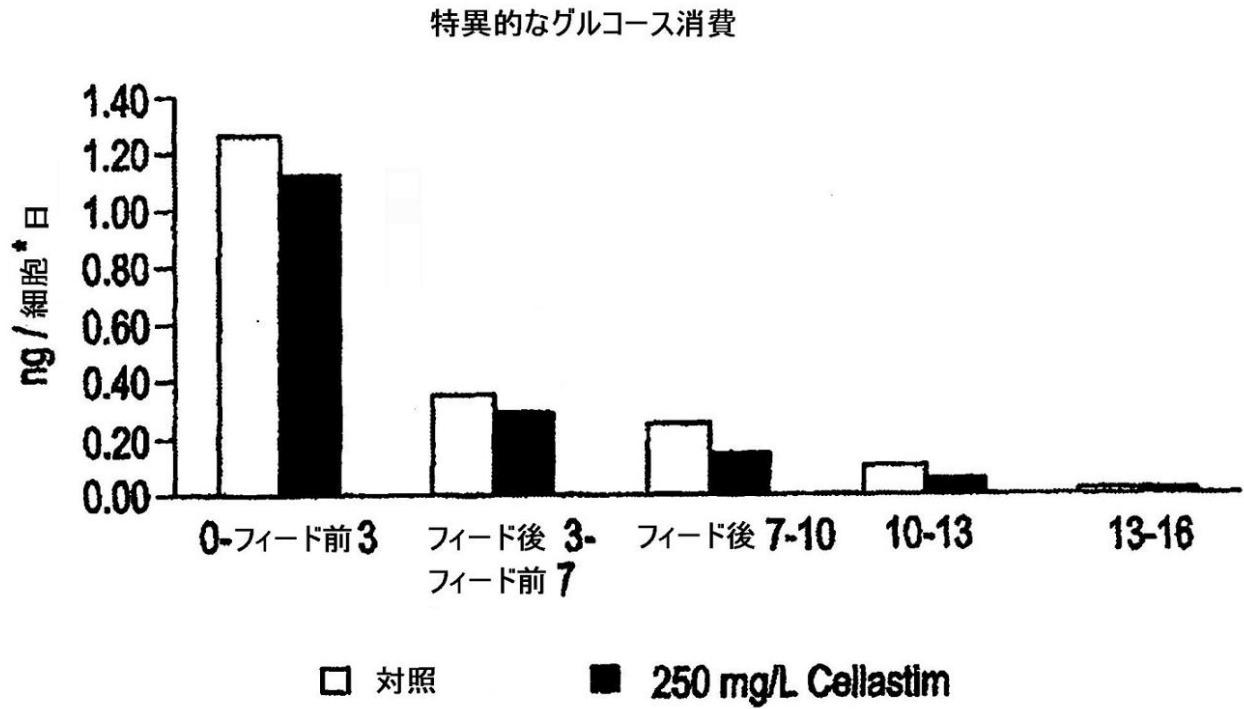
【図 1 4 A】



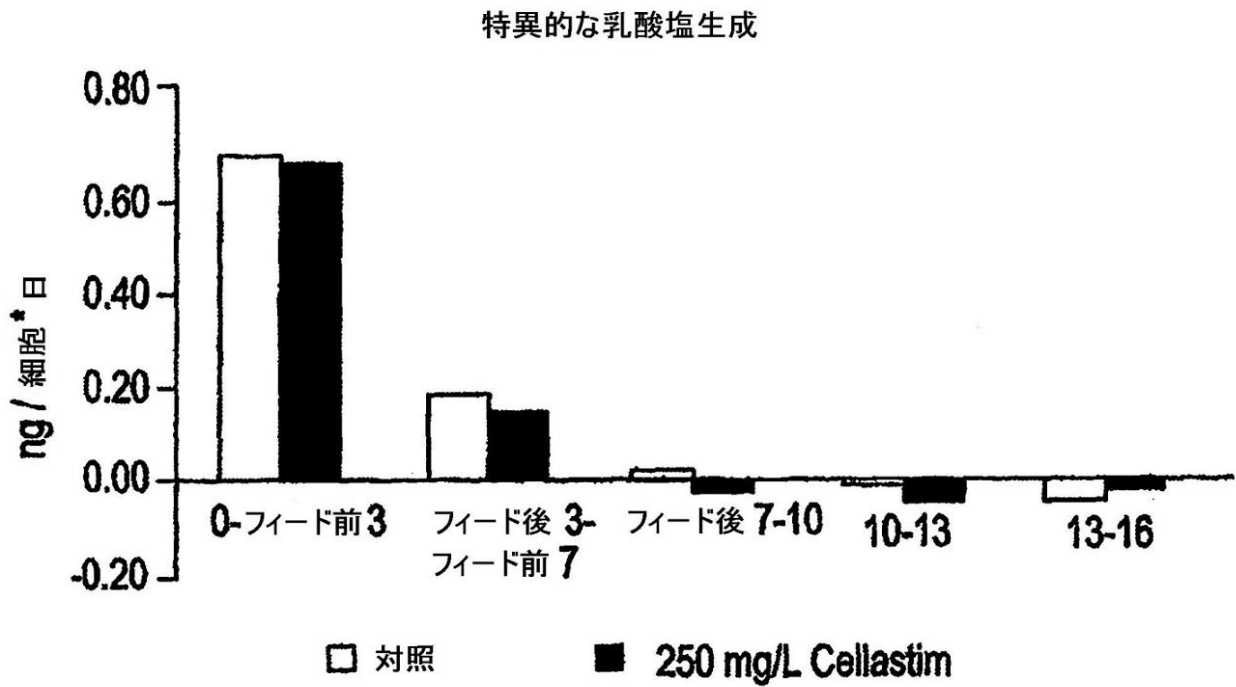
【図 1 4 B】



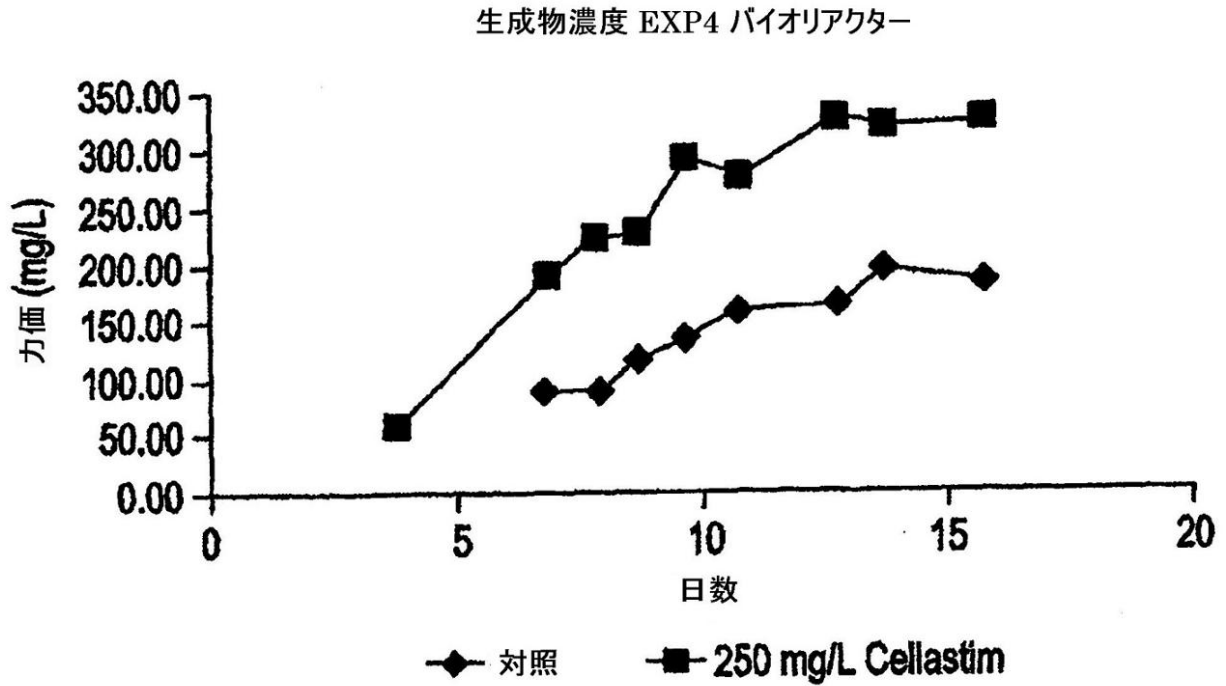
【図 15 A】



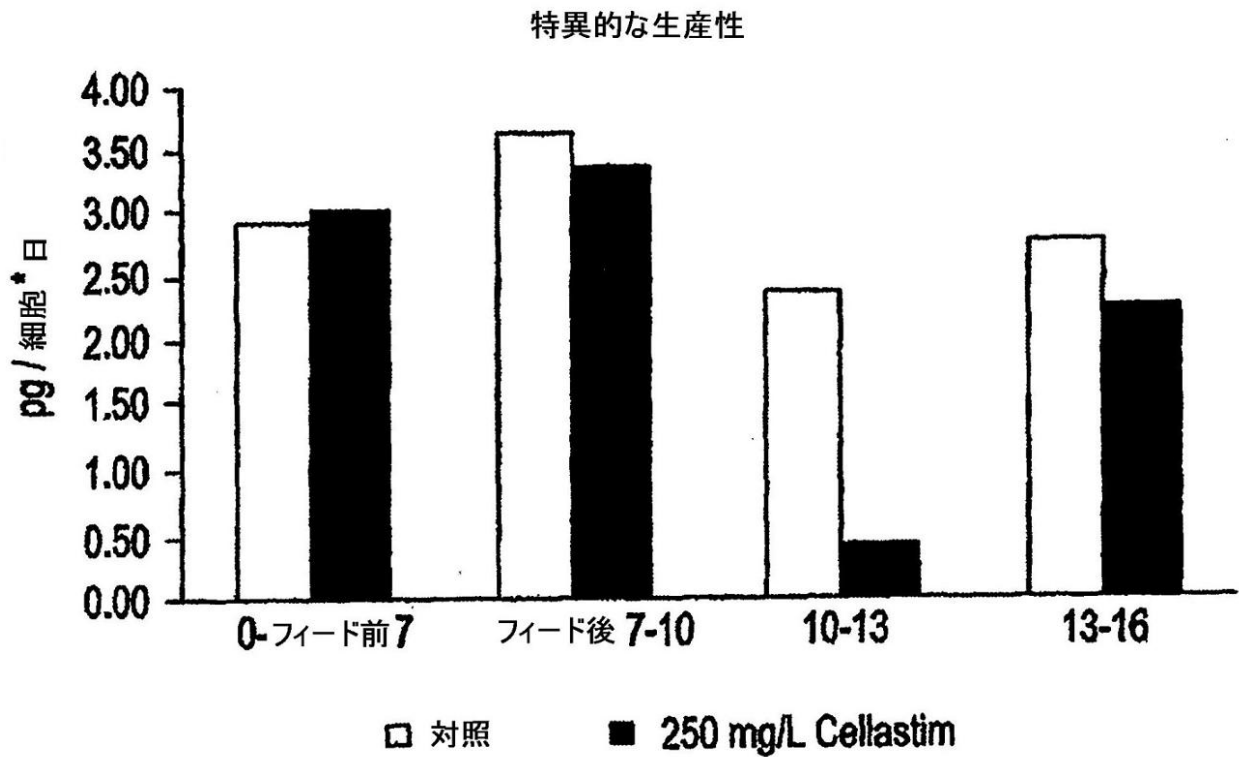
【図 15 B】



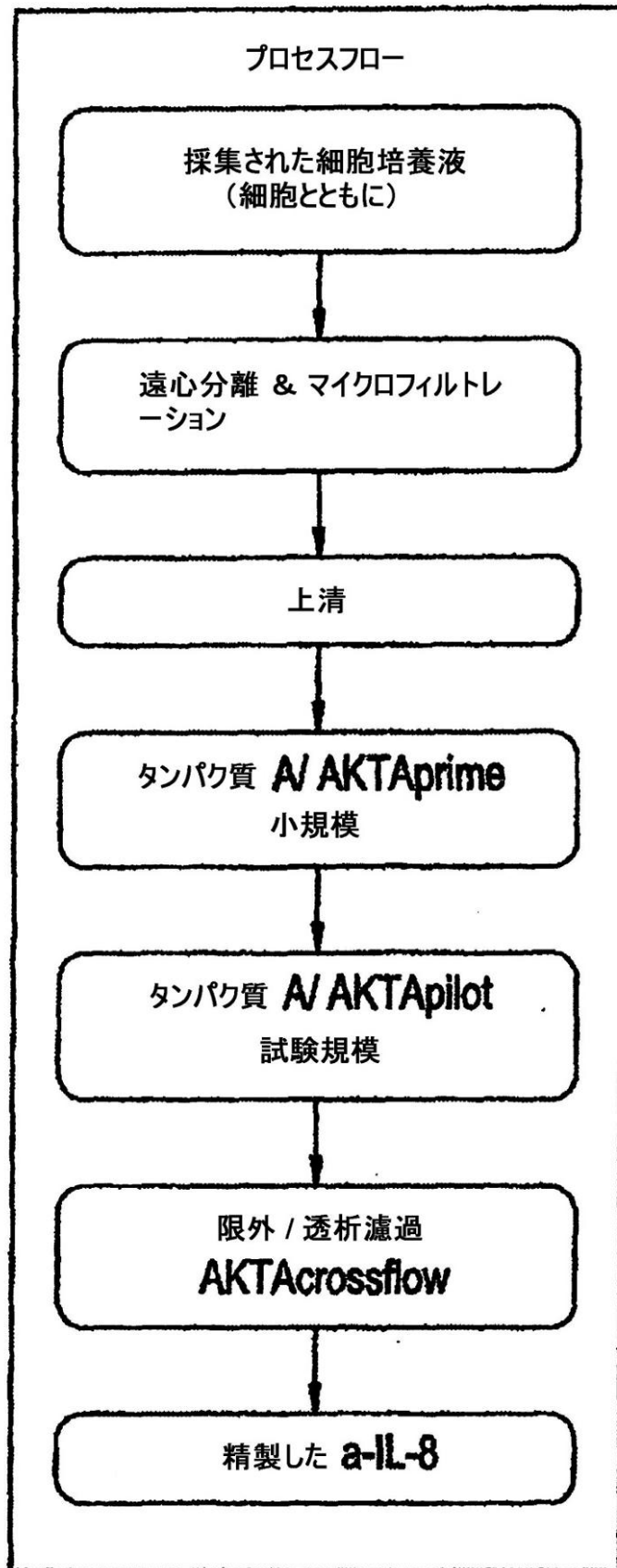
【図 16 A】



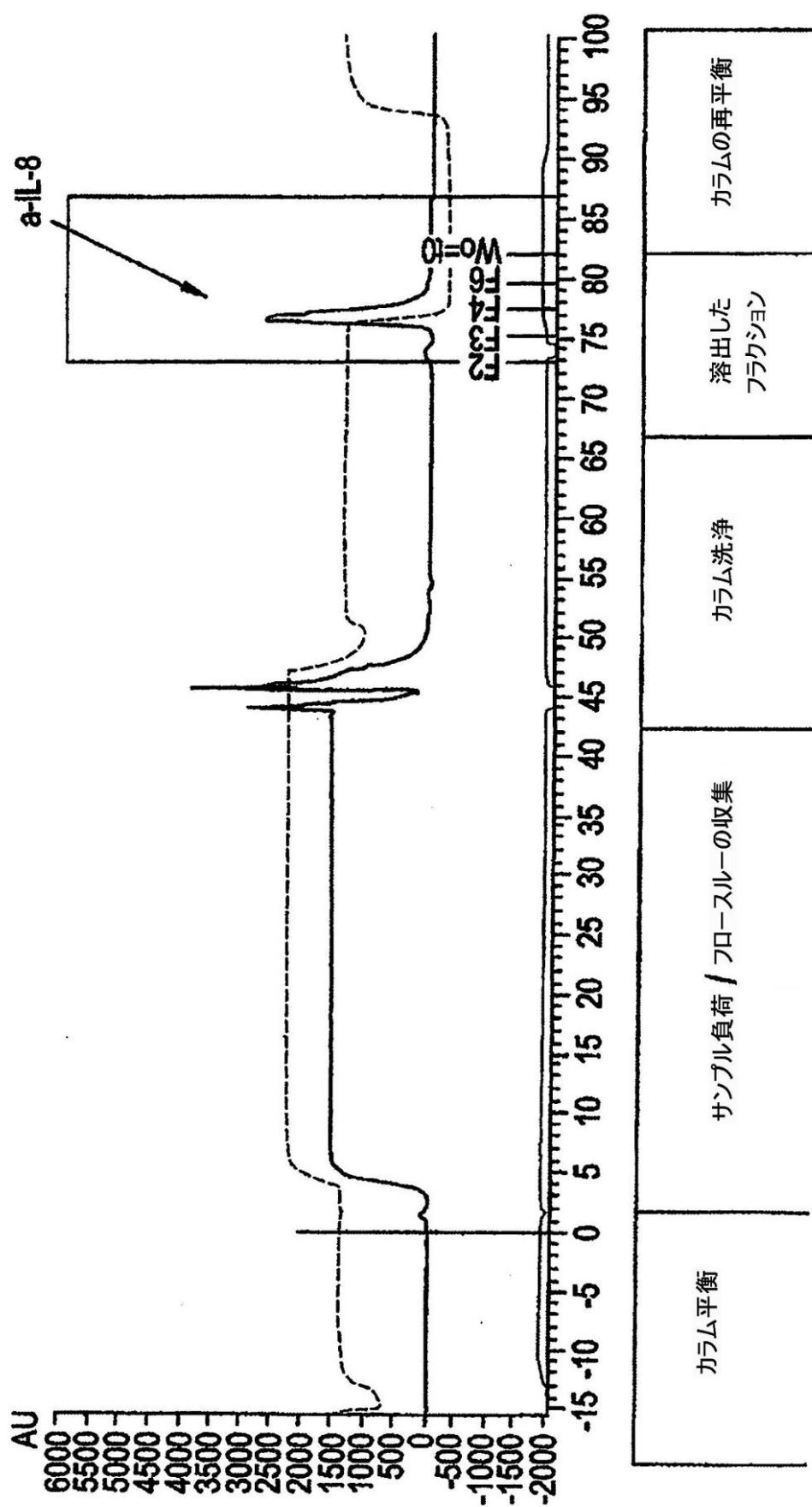
【図 16 B】



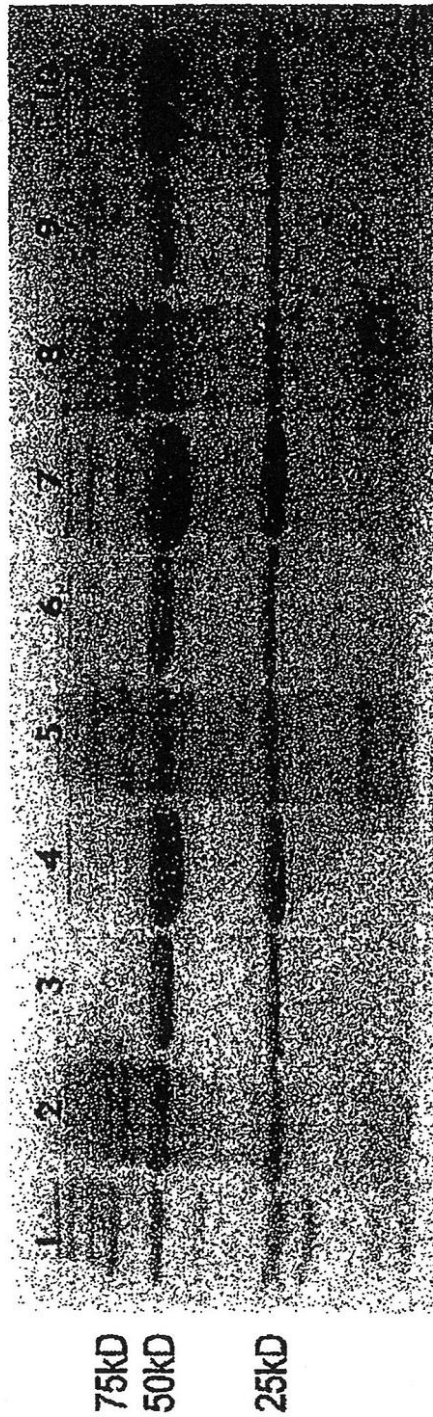
【図 17 A】



【図 17 B】

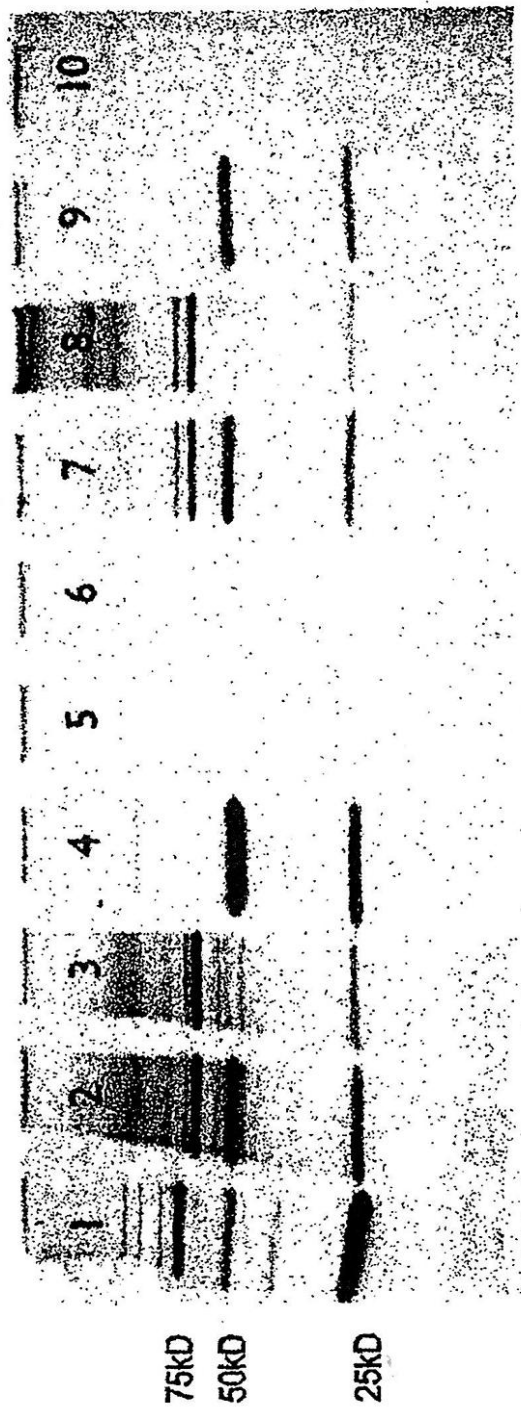


SDS-PAGE
クマシーブルー染色



1	タンパク質マーカー
2	上清 : 125/125 mg/L Cellastim/Lacromin
3	125/125 mg/L の Cellastim/Lacromin を含む上清からのタンパク質Aカラムによる精製した a-IL-8
4	#3 生成物の <u>UF</u> 精製した a-IL-8
5	上清 : 250 mg/L Cellastim
6	250 mg/L の Cellastim を含む上清からのタンパク質Aカラムによる精製した a-IL-8
7	#6 生成物の <u>UF</u> 精製した a-IL-8
8	上清 500 mg/L Cellastim
9	500 mg/L の Cellastim を含む上清からのタンパク質Aカラムによる精製した a-IL-8
10	#9 生成物の <u>UF</u> 精製した a-IL-8

【図 19】



1	タンパク質マーカー
2	上清 : 250 mg/L Cellastim
3	#2 ランスルーのタンパク質Aカラムのフロースルーのフラクション (時点 : 10-11 分)
4	250 mg/L の Cellastim を含む上清からのタンパク質A カラムによる精製した a-IL-8
5	#2 ランスルーのタンパク質Aカラムの 廃棄フラクション (時点 : 59-60分)
6	カラム分解後のタンパク質Aカラムからの上清
7	上清 125/125 mg/L Cellastim/Lacromin
8	#7 ランスルーのタンパク質A カラムの フロースルーのフラクション (時点 : 10-11 分)
9	125/125 mg/L の Cellastim Lacromin を含む上清からのタンパク質Aカラムによる精製した a-IL-8
10	#7 ランスルーのタンパク質Aカラムの 廃棄フラクション (時点 : 47-48分)

【配列表】

2013517776000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/022229
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/02(2006.01)i, C07K 14/76(2006.01)i, C12N 5/07(2010.01)i, C12P 21/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/02; C12N 5/00; C12N 5/06; A61K 39/25; C12N 5/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: plant derived, plant produced, recombinant albumin, cell culture, recombinant product		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010-0015713 A1 (DEETER et al.) 21 January 2010 See abstract, figures 1-2, paragraphs 15, 24, and claims 1, 4.	1-21
A	WO 2006-047380 A2 (AMGEN, INC.) 04 May 2006 See the whole document.	1-21
A	US 6210683 B1 (BURKE et al.) 03 April 2001 See the whole document.	1-21
A	US 2007-0082394 A1 (MOSCATELLO) 12 April 2007 See the whole document.	1-21
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 OCTOBER 2011 (20.10.2011)		Date of mailing of the international search report 21 OCTOBER 2011 (21.10.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Kim Seung Beom Telephone No. 82-42-481-8746 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/022229

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 41, 42, 44-51
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 41, 42, 44-51 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 22-40, 43, 52-72
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/022229

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0015713 A1	21.01.2010	AU 2006-261687 A1 AU 2006-261687 B2 CA 2613697 A1 EP 1896568 A2 EP 1896568 A4 EP 2230311 A1 KR 10-2008-0039885 A WO 2007-002762 A2 WO 2007-002762 A3	04.01.2007 01.09.2011 04.01.2007 12.03.2008 29.04.2009 22.09.2010 07.05.2008 04.01.2007 04.01.2007
WO 2006-047380 A2	04.05.2006	US 2006-115901 A1 WO 2006-047380 A3	01.06.2006 04.05.2006
US 6210683 B1	03.04.2001	None	
US 2007-0082394 A1	12.04.2007	WO 2007-044418 A2 WO 2007-044418 A3	19.04.2007 23.04.2009

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 クローガン, マシュー, エス.

アメリカ合衆国 80525 コロラド州 フォート・コリンズ スイート 102 マイルストーン・ドライブ 2120

Fターム(参考) 4B065 AA90X BB19 BB32 BB34 BB37 CA10 CA44